

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**REPRODUÇÃO DE PAPAGAIO-VERDADEIRO (*Amazona  
aestiva*) EM CATIVEIRO: PERFIL ANUAL DE ESTERÓIDES  
SEXUAIS E ENSAIO DE ESTÍMULO HORMONAL EXÓGENO**

**Mauricio Durante Christofolletti**

**Médico Veterinário**

**2014**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**REPRODUÇÃO DE PAPAGAIO-VERDADEIRO (*Amazona  
aestiva*) EM CATIVEIRO: PERFIL ANUAL DE ESTERÓIDES  
SEXUAIS E ENSAIO DE ESTÍMULO HORMONAL EXÓGENO**

**Mauricio Durante Christofolletti**

**Orientador: Prof. Dr. José Mauricio Barbanti Duarte**

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências  
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de  
Jaboticabal, como parte das exigências para  
a obtenção do título de Doutor em Medicina  
Veterinária (Reprodução Animal)**

**2014**

C556r Christofoletti, Mauricio Durante  
Reprodução de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) em  
cativoiro : perfil anual de esteróides sexuais e ensaio de estímulo  
hormonal exógeno / Mauricio Durante Christofoletti. -- Jaboticabal,  
2014  
xiii, 59 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014

Orientador: José Mauricio Barbanti Duarte

Banca examinadora: Lindsay Unno Gimenes, Eveline dos Santos  
Zanetti, Denise Calisto Bongalhardo, Ricardo José Garcia Pereira  
Bibliografia

1. Endocrinologia. 2. GnRH. 3. Psittaciformes. I. Título. II.  
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.68

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

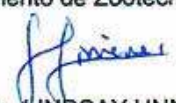
**TÍTULO:** REPRODUÇÃO DE PAPAGAIO-VERDADEIRO (*Amazona aestiva*) EM CATIVEIRO:  
 PERFIL ANUAL DE ESTERÓIDES SEXUAIS E ENSAIO DE ESTÍMULO HORMONAL  
 EXÓGENO

**AUTOR:** MAURICIO DURANTE CHRISTOFOLETTI


**ORIENTADOR:** Prof. Dr. JOSE MAURICIO BARBANTI DUARTE

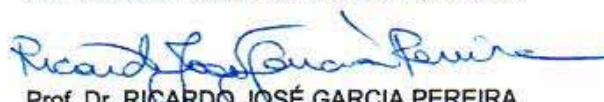
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA  
 VETERINÁRIA, Área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

  
 Prof. Dr. JOSE MAURICIO BARBANTI DUARTE  
 Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
 Profa. Dra. LINDSAY UNNO GIMENES  
 Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências  
 Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
 Profa. Dra. EVELINE DOS SANTOS ZANETTI  
 Pós-Doutoranda / Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de  
 Jaboticabal

  
 Profa. Dra. DENISE GALISTO BONGALHARDO  
 Universidade Federal de Pelotas / Pelotas/RS

  
 Prof. Dr. RICARDO JOSÉ GARCIA PEREIRA  
 Universidade de São Paulo / São Paulo/SP

Data da realização: 03 de fevereiro de 2014.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**MAURICIO DURANTE CHRISTOFOLETTI** – nascido na cidade de Santos, no dia 07 de junho de 1983, em março de 2002 ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista (FCAVJ – UNESP), obtendo o título de Médico Veterinário em janeiro de 2007. Na graduação realizou diversos estágios na área de Animais Selvagens, foi bolsista do Programa de Iniciação Científica do PIBIC/CNPq entre agosto de 2005 e julho 2006, trabalho que lhe rendeu o prêmio Jovem Pesquisador no X Congresso e XV Encontro da Associação Brasileira de Animais Selvagens em 2006. Realizou seu mestrado no Programa de Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal, da FCAVJ – UNESP como bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) durante março de 2008 a fevereiro de 2010, trabalho que lhe rendeu o prêmio na categoria profissional no XX Encontro e XIV Congresso da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens em 2011. Em março de 2010, ingressou no programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da FCAVJ – UNESP, recebendo apoio da FAPESP a partir de 2011. Durante o curso de doutorado realizou estágio na *Loro Parque Fundacion* nos meses de abril e maio de 2014.

Dedico

A memória de meu irmão Tony em nome de todos os momentos felizes que  
tivemos, por sua amizade, pelos ensinamentos de vida que me deixou e  
por todo orgulho que eu sinto por ele

“A ciência permanecerá sempre a satisfação do desejo mais alto da  
nossa natureza, a curiosidade; fornecerá sempre  
ao homem o único meio que ele possui de  
melhorar a própria sorte.”

*Ernest Renan*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Tom e Gabriela, por permitir que eu alcançasse esta realização profissional e pessoal com o suporte familiar baseado em muito carinho e um apoio incondicional. Vocês são um exemplo para mim. Amo vocês.

Aos meus irmãos Tony e Raquel por todo respeito e amizade. Vocês são peças fundamentais na minha felicidade.

A minha noiva Cristiane (“Atoa”) pelo amor, amizade, carinho, companheirismo, dedicação e apoio. E por toda ajuda direta durante todas as etapas deste trabalho. Não imagino minha vida sem você. Te amo muito.

Ao Neodival, Marta e Adriane pelo acolhimento na família e momentos sempre especiais.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Mauricio Barbanti por todos ensinamentos, confiança, amizade e suporte na realização da minha pós-graduação. Seu trabalho na conservação de animais selvagens é exemplar e tenho muito orgulho de ter feito parte da sua equipe por tantos anos. Conte sempre comigo.

A todos os membros do NUPECCE por todo apoio braçal na realização deste trabalho e por fazer minha rotina diária mais feliz. Sou muito grato a todos e sentirei muita falta de vocês. Faço um agradecimento especial ao funcionário Beterraba pela ajuda semanal na produção da ração utilizada no meu experimento.

Ao Prof. Dr. Ricardo J. G. Pereira, na prática meu co-orientador neste trabalho e também em toda minha pós-graduação. Seu exemplo e seu ensinamento foram fundamentais na minha carreira. Sou muito grato por sua amizade também.

Aos meus amigos da República Nazarena. Ferruge, Quaiada, Sumô, Gozado, Pará, Cagador e Crema: considero vocês como parte de minha família. Minha trajetória não teria sido tão especial sem vocês ao meu lado. Em especial a nossa “matriarca” Sandra, que fez de seu trabalho uma oportunidade de nos criar como filhos.



A todos os meus amigos de Jaboticabal, em especial ao Spinha, Onça, Pici, Gi, Gabi, Tekila, Ellen e Rabiola. A amizade e companhia de vocês são as melhores que existem.

Ao meu compadre Rodrigo e sua linda família que nunca deixou a distância diminuir nosso laço de amizade e parceria.

A Ju, André e Andrézinho por serem tão presentes em todos os momentos da minha vida. A amizade e a família de vocês são uma referência pra mim.

Aos meus amigos de tempo de Colégio Integração pela oportunidade de rearmos nossa amizade com a mesma intensidade e fraternidade da época que éramos crianças.

Ao Criadouro Comercial Brisa pelo fornecimento da estrutura e dos animais.

Ao Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi pelo apoio na formulação da ração utilizada neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira pelo suporte estatístico.

E a FAPESP pelo apoio financeiro e bolsa-de-estudo.

## SUMÁRIO

	Página
<b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>14</b>
Introdução.....	14
Revisão de Literatura.....	16
Objetivos.....	22
Hipóteses.....	22
Referências Bibliográficas.....	22
<b>CAPÍTULO 2 – PERFIL ANUAL DE PROGESTÁGENOS E ANDRÓGENOS UROFCAIS DE PAPAGAIO-VERDADEIRO (AMAZONA AESTIVA) EM CATIVEIRO.....</b>	<b>28</b>
Introdução.....	29
Material e Métodos.....	31
Resultados.....	36
Discussão.....	44
Referências Bibliográficas.....	50
<b>CAPÍTULO 3 – EFEITO DO USO DE ANÁLOGO DE GNRH DE LIBERAÇÃO LENTA NA REPRODUÇÃO EM CATIVEIRO DE PAPAGAIO-VERDADEIRO (AMAZONA AESTIVA).....</b>	<b>53</b>
Introdução.....	54
Material e Métodos.....	57
Resultados.....	61
Discussão.....	66
Referências Bibliográficas.....	68



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 009350/11 do trabalho de pesquisa intitulado "**Reprodução de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) em cativeiro: perfil anual de esteróides sexuais e ensaio de estímulo hormonal exógeno**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 12 de Maio de 2011.

Jaboticabal, 13 de Maio de 2011.

**Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui**  
Presidente - CEUA

**Med. Vet. Maria Alice de Campos**  
Secretária - CEUA

## REPRODUÇÃO DE PAPAGAIO-VERDADEIRO (*Amazona aestiva*) EM CATIVEIRO: PERFIL ANUAL DE ESTERÓIDES SEXUAIS E ENSAIO DE ESTÍMULO HORMONAL EXÓGENO

**RESUMO** - O Brasil é o país com a maior diversidade de psitacídeos do mundo, abrigando 72 espécies reconhecidas, com 16 espécies presentes no “Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção”. O papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) se destaca por sua popularidade como animal de estimação, sendo coletado na natureza em grande número para atender ao mercado ilegal de animais silvestres. Sua reprodução em cativeiro pode se tornar uma ferramenta para a conservação das populações na natureza, porém isso exige uma criação baseada em conhecimentos científicos e técnicas avançadas de reprodução. Esta tese teve como objetivos apresentar o perfil anual endócrino dos esteroides sexuais do *Amazona aestiva* e realizar um ensaio de estímulo hormonal através da aplicação de análogo de GnRH de liberação lenta na espécie. Utilizamos 10 casais e 4 machos adultos da espécie *Amazona aestiva* mantidos em viveiros suspensos, pertencentes ao Criadouro da Brisa, situado Jaboticabal/SP. As excretas foram coletadas ao menos uma vez por semana entre junho de 2011 e julho de 2012 para entendimento dos processos endócrinos que regem a reprodução da espécie e entre agosto de 2012 e dezembro de 2012 no ensaio de estímulo hormonal. O monitoramento da atividade gonadal foi feita de forma não invasiva por mensuração de metabólitos de andrógenos nas excretas dos machos e de progestágenos nas excretas de fêmeas. Foram coletadas amostras frescas de excretas, sempre no período entre 14h as 17h, e mantidas congeladas até o processamento. As amostras foram secas em estufa a 57°C, trituradas e os hormônios extraídos utilizando metanol a 80%. A dosagem hormonal foi realizada no Laboratório de Endocrinologia do NUPECCE (Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos) utilizando ensaio imunoenzimático com o anticorpo para andrógenos e progestágenos. No ensaio de estímulo hormonal exógeno com analago de GnRH foi aplicado busarelina de liberação lenta em 5 casais e 5 casais foram utilizados com controle, seguindo a coleta de excretas, processamento e dosagem hormonal descritos anteriormente. Os resultados do perfil anual de andrógenos nos machos *A.aestiva* apresentaram uma oscilação anual com níveis mais altos nos meses de postura, porém sem apresentar diferenças entre machos reprodutores e não-reprodutores; no de progestágenos foi possível observar um aumento exacerbado nos níveis durante postura com permanência em baixos níveis fora da reprodução. Os resultados do ensaio de estímulo hormonal apresentou nos machos um aumento nos níveis de andrógenos no grupo tratado comparado ao grupo controle, e nas fêmeas na aplicação da busarelina não influenciou os níveis hormonais. Concluímos que o perfil anual de esteroides sexuais em *A. aestiva* demonstrou que a espécie tem sua reprodução regulada hormonalmente como outras aves e que a dosagem hormonal pode ser uma ferramenta na reprodução em cativeiro. Também que o uso de análogo de GnRH para estímulo na reprodução desta espécie tem potencial estimulatório e deve ser melhor estudada para seu aprimoramento.

**Palavras-chave:** endocrinologia, monitoramento não-invasivo, Psittaciformes, GnRH

## REPRODUCTION OF BLUE-FRONTED AMAZON PARROT (*Amazona aestiva*) IN CAPTIVITY: ANNUAL PROFILE OF SEX STEROIDS AND EXOGENOUS HORMONE STIMULUS TEST.

**ABSTRACT** - Brazil is the country with the greatest diversity of parrots in the world , with to 72 recognized species , with 16 species in the " Red List of Endangered Brazilian Wild Animals " . The blue-fronted amazon parrot ( *Amazona aestiva* ) stands out for its popularity as a pet , being collected from the wild in large numbers to attend the illegal market for wildlife. His captive breeding can become a tool for the conservation of populations in nature , but this requires a creation based on scientific knowledge and advanced breeding techniques . This thesis aimed to present the annual endocrine profile of sex steroids of *Amazona aestiva* and a test of hormonal stimulation by applying GnRH analogue of the slow release. It was used 10 couples and 4 adult males of *Amazona aestiva* kept in suspended cages, properties of the commercial breeder "Criadouro da Brisa", located in Jaboticabal / SP. The droppings were collected at least once a week between June 2011 and July 2012 for the understanding of endocrine processes of the reproduction in this specie and between August 2012 and December 2012 for testing hormonal stimulation . The monitoring of gonadal activity was noninvasively by measuring androgen metabolites in droppings of males and females of droppings progestogens. Fresh droppings samples were collected , always in between 14h to 17h , and kept frozen until processing . The samples were dried at 57°C, crushed and hormones were extracted using 80% methanol . The hormone dosage was performed at the Laboratory of Endocrinology, NUPECCE ( Center for Research and Conservation of Deer ) using enzyme immunoassay with antibody to androgens and progestins . In exogenous hormone stimulation test with GnRH was applied analago buserelin slow release in 5 couples and 5 couples were used to control the following excreta collection , processing and hormonal dosage previously described . The results of the annual listing of androgens in males *A.aestiva* showed an annual oscillation with higher levels in the months of posture, but with no differences between males breeding and non-breeding, the progestogen was possible to observe an exaggerated increase in levels during posture to remain at low levels outside of reproduction. The test results of hormonal stimulation in males showed an increase in androgen levels in the treated group compared to the control group, and the application of buserelin did not influence the hormones levels in females . We conclude that the annual profile of sex steroids in *A. aestiva* species has shown that the reproduction hormonally regulated as poultry and other hormone dosage form can be a tool in captive breeding. Also the use of GnRH analogs to stimulate the reproduction of this specie has potential for stimulate and should be further investigated for its improvement.

**Key-words:** endocrinology, noninvasive monitoring, Psittaciformes, GnRH

## CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

### Introdução

A ordem Psittaciformes é composta por duas famílias, a Cacatuidae (21 espécies – Cacatuas, Calopsitas, etc.) e a família Psittacidae (332 espécies – Araras, Papagaios, Periquitos, etc.) (GALETTI et al., 2002). A família Psittacidae é distribuída pela zona tropical do globo, irradiando-se para zonas subtropicais e frias também. Dentre as 332 espécies desta família, 86 correm risco de extinção, com 36 próximas a esta condição, tendo como principais causas a perda de habitat, endogamia, perseguição humana para comércio e arte plumária, caça e coleta de ovos e filhotes e também a destruição das espécies de árvores utilizadas para ninho e alimentação (DEL HOYO et al., 1997; SNYDER et al., 2000; JUNIPER & PARR, 2003).

O Brasil é o país com a maior diversidade de psitacídeos do mundo, abrigando 72 espécies reconhecidas e por isso ficou conhecido no século XVI como “Terra dos Papagaios” (SICK, 1997). Dentre os psitacídeos brasileiros, 16 espécies estão no “Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção”. Entre elas, há duas espécies extintas na natureza: a Arara-azul-pequena (*Anodorhynchus glaucus*) e a Ararinha-azul (*Cyanopsitta spixii*). Entre os gêneros com os maiores números de espécies ameaçadas de extinção estão o gênero *Pyrrhura* (*P. anaca*, *P. cruentata*, *P. lepida coerulescens*, *P. lepida lepida*, *P. leucotis* e *P. pfrimeri*) e o gênero *Amazona* (*A. brasiliensis*, *A. pretrei*, *A. rhodocorytha*, *A. vinacea*) (SILVEIRA & STRAUBE, 2008).

Dentre as 27 espécies de papagaios (gênero *Amazona*) que ocorrem na América Central e do Sul, o papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) se destaca por sua popularidade como animal de estimação, principalmente pela sua coloração exuberante e habilidade para aprender a imitar a fala humana (SEIXAS & MOURÃO, 2002). Em toda sua ampla área de distribuição (noroeste do Brasil, leste da Bolívia, norte da Argentina e sul do Paraguai), o papagaio-verdadeiro vem sendo coletado, legal ou ilegalmente, em grandes números, para atender ao mercado de animais silvestres de estimação (THOMSEN & BRAUTIGAM, 1991).

O papagaio-verdadeiro não está na lista de espécies ameaçadas do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), porém este psitacídeo tem sido sistematicamente afetado por várias ameaças, principalmente a retirada de animais da natureza para servirem como animais de estimação. Somente um ponto de recepção de animais silvestres do Mato Grosso do Sul, o Centro de Reabilitação de Animais Silvestres – CRAS, recepcionou mais de 2500 filhotes de papagaio-verdadeiro, oriundos de apreensões, durante a década de 90 (SEIXAS & MOURÃO, 2002). Na Argentina, onde a prática de retirada de animais silvestres da natureza em forma de cota é uma atividade legal, o número de papagaios-verdadeiros capturados entre 1981 e 1987 foi de 204 mil indivíduos (BEISSINGER & BUCHER, 1992). Estes números demonstram a demanda por estas aves no mercado nacional e internacional.

Tendo em vista este mercado crescente, a reprodução de psitacídeos em cativeiro, de forma legal, pode se tornar uma ferramenta importante para a conservação das populações na natureza. Para isto é necessário uma criação profissional em cativeiro, não amadorista, baseada em conhecimentos científicos e utilizando técnicas avançadas e atuais de reprodução, como nos animais domésticos.

Um dos aspectos mais importantes no progresso da eficiência reprodutiva das espécies é o conhecimento dos processos endócrinos relacionados à reprodução. Este conhecimento isolado do status reprodutivo pode ser um bom indicador de bem-estar individual, mas quando integrado com outros conhecimentos pode se tornar uma ferramenta importante no manejo em cativeiro (PICKARD, 2003). O monitoramento endócrino de esteróides pode ser utilizado na avaliação de mudanças no ciclo reprodutivo, como o início da puberdade, duração da receptividade sexual, sazonalidade, início da senescência reprodutiva e impacto de fatores ambientais na saúde reprodutiva das espécies (DONOGHUE et al., 2003).

Sendo assim, este estudo teve o intuito de aumentar o conhecimento a respeito da endocrinologia reprodutiva da espécie *Amazona aestiva* pelo monitoramento endócrino não-invasivo, buscando assim subsídios para melhorar a criação destas aves em cativeiro. Também pretendeu avaliar o efeito de um análogo

de hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) na atividade reprodutiva do papagaio-verdadeiro, que poderia contribuir para aumentar os índices reprodutivos em cativeiro tanto dessa espécie, criada comercialmente, como de outras espécies ameaçadas em programas de conservação “ex situ”.

## **Revisão de Literatura**

### **Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*)**

A espécie *Amazona aestiva*, popularmente conhecida como papagaio-verdadeiro, é uma das representantes brasileiras do gênero *Amazona* na família Psittacidae, ordem Psittaciformes. Os indivíduos desta espécie são de porte médio, com peso de aproximadamente 400g e 37cm de comprimento, coloração predominantemente verde, cabeça amarela com fronte azul, pés e bicos pretos (FORSHAW, 2010.) A espécie apresenta duas subespécies que se diferenciam pela coloração da região de encontro das asas, sendo vermelho no *A. aestiva aestiva* e amarelo no *A. aestiva xanthopteryx* (DARRIEU, 1983).

O papagaio-verdadeiro se destaca entre os psitacídeos brasileiros por ser considerado uma espécie popular, com grande habilidade de imitação da fala humana e aprendizado de vocabulário, além de uma bela plumagem (FORSHAW, 2010; SICK, 1997).

São aves de hábitos monogâmicos, comumente vistos em casais. O casal se reproduz apenas uma vez ao ano, com período reprodutivo entre julho e dezembro (SEIXAS, 2007). Utiliza-se de diversos tipos de árvores para nidificação, em áreas de pasto, savana aberta, manchas de florestas e áreas alagadas, preferencialmente em árvores isoladas (SEIXAS & MOURÃO, 2002). A fêmea faz a postura de dois a quatro ovos, com o período de incubação de 24 a 29 dias, gerando filhotes dependentes de cuidado parental por um período de quatro a cinco meses (FORSHAW, 2010; SICK, 1997).

A distribuição desta espécie ocorre desde o nordeste do Brasil, com registros pelo leste do Paraguai e Bolívia, alcançando até o norte da Argentina (FORSHAW, 2010; SICK, 1997). Sua ampla distribuição define sua classificação pela IUCN



(International Union for Conservation of Nature and Natural Resources), como “Pouco preocupante” (Least Concern), porém a instituição ressalta que a espécie está passando por um decréscimo no número de indivíduos (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2012), que pode ser atribuído a expansão das atividades agropecuárias, exploração imobiliária e desmatamento, e ainda a captura de filhotes para abastecer o comércio ilegal de animais selvagens, que por muitas vezes é feito com a derrubada da árvore utilizada como ninho (BOLKOVIC & RAMADORI, 2006). Por isso, a espécie está incluída no Apêndice II da CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2012), lista no qual estão citadas as espécies que mesmo não estando em perigo de extinção precisam ter seu comércio regularizado para que tal fato não ocorra.

Esse potencial comercial da espécie demonstra que criação comercial de psitacídeos tem papel fundamental na preservação das populações nativas e deve ser estimulada e aprimorada. Ela atua indiretamente contra o tráfico de espécies selvagens fornecendo indivíduos nascidos em cativeiro, sem qualquer malefício a população nativa, e aptos a saciar o desejo da sociedade em possuir animais selvagens como animais de estimação. Além do mais, a criação comercial, comparado ao tráfico de animais selvagens, fornece aves saudáveis, sem maus-tratos e com cuidados especiais para sua socialização.

Apesar de sua popularidade e representação em cativeiro, poucos são os estudos com *A. aestiva* e seu manejo em cativeiro, principalmente relacionado à reprodução. O pouco conhecimento que existe envolve dados sobre a biologia e ecologia em vida livre realizados no Brasil e Argentina (SEIXAS & MOURÃO, 2002; BOLKOVIC & RAMADORI, 2006). Portanto a realização de estudos relacionados a aspectos fisiológicos e manejo reprodutivo se fazem necessários no aperfeiçoamento da manutenção desta espécie sob vida cativa.

### Endocrinologia reprodutiva em Aves

Os processos reprodutivos das aves diferem substancialmente de outros animais, pois as aves ovulam um único ovócito em intervalos freqüentes e devem

produzir um ovo fértil com todas as necessidades do embrião em desenvolvimento sem qualquer interferência direta posterior materna (PROUDMAN, 2004), e essas diferenças também são observadas na endocrinologia.

As aves possuem somente uma fase folicular e sem necessidade de formação de um corpo lúteo como os mamíferos, porém, o ciclo de crescimento folicular e as flutuações endócrinas que levam a ovulação são chamados de ciclo ovulatório (PROUDMAN, 2004).

A fase pré-ovulatória nas aves é a mais curta das fases e sua duração está associada ao tamanho da espécie, do peso do ovo e da precocidade do filhote que irá nascer, geralmente tendo a duração entre 6 e 16 dias (JOHNSON & WOODS, 2007). Nesta fase, a produção de esteróides pelas células da granulosa e da teca é predominantemente regulada pela atividade do hormônio luteinizante (LH). A camada da granulosa produz progesterona que atua como precursor na síntese da testosterona e androstenediona pela camada da teca e em menor grau pelas células da granulosa. Já a camada da teca produz principalmente a androstenediona pela camada interna, enquanto a externa sintetiza estrógeno (JOHNSON, 2000).

Os níveis de progesterona aumentam progressivamente antes da ovulação e, como o LH, tem seu pico próximo ao momento da ovulação, sendo este aumento da progesterona requerido para o pico de LH ocorrer. Esta interação entre LH e progesterona é alimentada através de um feedback positivo (POLLOCK & OROSZ, 2002). A progesterona tem um papel fundamental na ovulação nas aves, pois a injeção sistêmica e intraventricular de progesterona pode induzir tanto o pico de LH como a ovulação prematura, enquanto que a administração de anti-soro de progesterona antes do surgimento do pico de progesterona pode bloquear a ovulação. Além disso, em estudos que bloquearam este aumento da progesterona na fase pré-ovulatória, não houve o aumento dos níveis de LH. Em outros estudos onde foram bloqueados o aumento dos níveis de testosterona e estrógeno, a injeção de progesterona induziu um pico pré-ovulatório normal de LH (JOHNSON, 2000).

A maior parte do estrógeno existente no ciclo ovulatório é produzida pelos folículos pré-hierárquicos, porém assim como a testosterona, os estrógenos não são

fundamentais para indução da secreção de LH ou da ovulação. Os estrógenos são os responsáveis pela regulação do metabolismo do cálcio, características sexuais secundárias como cor e forma da plumagem e pelo controle dos comportamentos sexuais (JOHNSON, 2000; CROSTA et al., 2003).

Nos machos, a ação das gonadotropinas se assemelha muito aos mecanismos observados em mamíferos. O LH estimula as células de Leydig a produzir testosterona e androstenediona, enquanto que o hormônio folículo-estimulante (FSH) atua sobre as células de Sertoli, com mecanismo de ação pouco conhecido ainda, mas sabe-se que sua ação é potencializada com a testosterona (CROSTA et al., 2003). Esta produção de testosterona estimula a espermatogênese, o crescimento do epidídimo, e desenvolvimento dos túbulos, especialmente dos ductos deferentes (POLLOCK & OROSZ, 2002). Outra atuação da testosterona é atribuída ao controle dos comportamentos sexuais envolvendo a instalação e defesa de territórios ou de ninhos durante a época reprodutiva, além dos comportamentos de canto e agressão (POLLOCK & OROSZ, 2002).

A maioria do conhecimento acumulado sobre a fisiologia endócrina da reprodução das aves foi obtido no estudo com aves domésticas, principalmente galinhas, perus, codornas e ganso. Isso porque os estudos tradicionais de monitoramento endócrino envolvem colheitas repetidas de sangue, sendo portanto acessível somente em animais domésticos, devido ao estresse gerado, riscos de acidentes e disponibilidade de animais.

Nas últimas décadas, houve um progresso substancial no estudo e entendimento da endocrinologia reprodutiva das aves selvagens (ELPHICK et al., 2007), fato relacionado à crescente utilização de técnicas não-invasivas de monitoramento endócrino. Pode-se destacar atualmente as principais utilizações destas técnicas na mensuração de metabólitos urofecais de hormônios esteróides (Progestágenos, Estrógenos, Andrógenos e Glucocorticóides) para a caracterização de perfis endócrinos, acesso ao status reprodutivo e identificação de distúrbios reprodutivos em aves selvagens (WASSER & HUNT, 2005; JENSEN & DURRANT, 2006; STALEY et al., 2007; PEREIRA, 2008).

Este progresso na endocrinologia de aves selvagens vem acompanhado da manipulação hormonal para inibição ou para a estimulação da reprodução (ELPHICK et al., 2007). No estímulo da reprodução em cativeiro, a hormônio terapia com GnRH tem obtido resultados positivos (JAWOR et al., 2006; ROBBE et al. 2008; CONSTANTINI et al., 2009; ELNAGAR, 2009).

O GnRH é um hormônio produzido pelo hipotálamo com a função de regular a reprodução nos vertebrados. A estimulação nervosa resulta na ativação do sistema porta-hipotálamo-hipofisário com a liberação de pulsos de GnRH que estimulam a secreção de FSH e LH da hipófise anterior (HAFEZ et al., 2004). Nas aves já foram isolados três diferentes isômeros: o chicken GnRH-I (c-GnRH-I), o chicken GnRH-II (c-GnRH-II) e o recém descoberto em pássaros canoros, lamprey GnRH-III (ir-I-GnRH-III) (KING & MILLAR, 1982a, b; MIYAMOTO et al., 1984; KING & MILLAR, 1995; BENTLEY et al., 2004).

Nas aves, o papel do c-GnRH-I está relacionado ao controle do hormônio FSH e do LH, porém esta influência sobre o FSH não está totalmente esclarecida (SHARPEN & CICCONE, 2005; RITCHIE & PILNY, 2008). O efeito sobre o LH é estimulatório, uma vez que o aumento dos níveis de c-GnRH-I está ligado à liberação de LH (DUNN & MILLAM, 1998). Já as funções do c-GnRH-II e do ir-I-GnRH-III permanecem como um enigma (BENTLEY et al., 2004).

A administração de GnRH específico de aves ou de análogos do GnRH de mamíferos estimulou a atividade reprodutiva em diferentes espécies de aves, produzindo aumento de LH plasmático, desenvolvimento gonadal, modificação de comportamentos sexuais e produção de filhotes em estação não-reprodutiva (STERLING & SHARP, 1984; MINOIA et al., 1984; CONSTANTINI et al., 1985; McNAUGHTON et al., 1995; CONSTANTINI et al., 2009).

Um exemplo da utilização de um análogo sintético ao GnRH (acetato de busarelina) em aves ocorreu em galos domésticos Alexandria, demonstrando um efeito estimulatório, promovendo o aumento dos níveis de testosterona circulante, o volume do ejaculado, a concentração e a motilidade espermática destes animais (ELNAGAR, 2009).

Já em aves silvestres, o resultado do estímulo com GnRH pode ser influenciado pela sazonalidade reprodutiva, principalmente quanto aos aspectos ligados ao fotoperíodo e a fotorrefratariedade. A aplicação subcutânea de lecirelina (análogo ao GnRH de mamíferos) em canários belgas (*Serinus canaria*) fora de sua época reprodutiva promoveu a primeira postura muito mais cedo, porém somente ocorreu uma segunda postura com os casais que foram submetidos a um fotoperíodo artificial correspondente à época reprodutiva, demonstrando a dependência da atividade reprodutiva à estimulação da luz (CONSTANTINI et al, 1985). O mesmo aconteceu em Juncos (*Junco hyemalis*), tendo os níveis de testosterona significativamente elevados quando submetidos à aplicação intramuscular de c-GnRH durante o período de reprodução, com a diminuição crescente da resposta ao fármaco conforme a proximidade da época não-reprodutiva (JAWOR et al., 2006).

Atualmente existem poucos relatos de estudos com psitacídeos relacionados aos efeitos da utilização de GnRH na reprodução desta família. Em um trabalho com periquito-australiano (*Melopsittacus undulatus*) foi avaliado o efeito do uso de um implante de liberação lenta de acetato de buserelina na atividade reprodutiva desta espécie, por meio do monitoramento endócrino e acompanhamento dos parâmetros reprodutivos (taxa de postura e de fertilidade) (CONSTANTINI et al., 2009). Os casais que receberam o implante apresentaram taxas superiores de postura, maior proporção de fertilidade dos ovos e maior concentração dos níveis de esteróides excretados, porém sem modificar os perfis típicos de excreção quando comparado aos outros casais que não receberam o implante.

Os resultados obtidos neste trabalho ressaltam a importância de novos estudos com outras espécies para determinar o melhor emprego deste fármaco em programas de reprodução em cativeiro, inclusive no auxílio a espécies ameaçadas de extinção com problemas reprodutivos (CONSTANTINI et al., 2009).

### **Objetivos**

- \* Validar ensaio imunoenzimático para dosagem hormonal de progestágenos e andrógenos de excretas de Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*);
- \* Definir o padrão de excreção de hormônios esteróides sexuais de progestágenos e andrógenos de excretas de Papagaio-verdadeiro durante o período reprodutivo normal da espécie em cativeiro;
- \* Avaliar o efeito do uso de um análogo de GnRH nos índices reprodutivos e perfis endócrinos de Papagaio-verdadeiro;

### **Hipóteses**

- \* A mensuração de metabólitos de progestágenos e andrógenos urofecais em *Amazona aestiva* pode ser utilizado na seleção de casais com potencial reprodutivo.
- \* A utilização de acetato de buserelina de liberação lenta tem efeito estimulatório na reprodução de *Amazona aestiva*.

### **Referências Bibliográficas**

BEISSINGER, S.; BUCHER, E. Sustainable harvesting of parrots for conservation. In: (Ed.). **New World parrots in crisis. Smithsonian Institution Press, Washington, DC**, 1992, p.73-115.

BENTLEY, G. E.; MOORE, I. T.; SOWER, S. A.; WINGFIELD, J. C. Evidence for a novel gonadotropin-releasing hormone in hypothalamic and forebrain areas in songbirds. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 63, n. 1, p. 34-46, 2003.

BIRDLIFE INTERNATIONAL 2012. *Amazona aestiva*. In: IUCN 2013. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2013.1. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 11 September 2013

COSTANTINI, V.; CINONE, F.; LACALANDRA, G. Early oviposition in *Serinus canaria* after endonasal administration of Gn-RH.(Preliminary research)]. **Bollettino della Società italiana di biologia sperimentale**, v. 61, n. 4, p. 633, 1985.

COSTANTINI, V.; CARRARO, C.; BUCCI, F.; SIMONTACCHI, C.; LACALANDRA, G.; MINOIA, P. Influence of a new slow-release GnRH analogue implant on reproduction in the Budgerigar (*Melopsittacus undulatus*, Shaw 1805). **Animal reproduction science**, v. 111, n. 2, p. 289-301, 2009.

CROSTA, L.; GERLACH, H.; BÜRKLE, M.; TIMOSSO, L. Physiology, diagnosis, and diseases of the avian reproductive tract. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 6, n. 1, p. 57-83, 2003.

DARRIEU, C. Revisión de las razas geográficas de *Amazona aestiva* (Linne)(Aves, Psittacidae). **Neotropica**, v. 29, n., p. 3-10, 1983.

DEL HOYO, J.; ELLIOT, A.; SARGATAL, J. **Handbook of the Birds of the World. Barcelona: Lynx Editions**, 1992

DONOGHUE, A.; BLANCO, J. M.; GEE, G.; KIRBY, Y.; WILDT, D. Reproductive technologies and challenges in avian conservation and management. In: (Ed.). **CONSERVATION BIOLOGY SERIES-CAMBRIDGE-**, 2003, p.321-337.

DUNN, I. C.; MILLAM, J. R. Gonadotropin releasing hormone: forms and functions in birds. **Poultry and avian biology reviews**, v. 9, n., p., 1998.

ELNAGAR, S. A. Response of Alexandria cockerels reproductive status to GnRH (Receptal) injection. **International Journal of Poultry Science**, v. 8, n. 3, p. 242-246, 2009.

ELPHICK, C. S.; REED, J. M.; DELEHANTY, D. J. Applications of reproductive biology to bird conservation and population management. In: (Ed.). **Reproductive biology and phylogeny of aves (birds). Enfield (NH): Science Publishers**. p, 2007, p.367-399.

FORSHAW, J. M. **Parrots of the World**: Princeton University Press, 2010

GALETTI, M.; GUIMARÃES JR, P.; MARSDEN, S. Padrões de riqueza, risco de extinção e conservação dos psitacídeos neotropicais. In: (Ed.). **Ecologia e conservação de psitacídeos no Brasil. Melopsittacus Publicações Científicas, Belo Horizonte**, 2002, p.17-26.

HAFEZ, E.; JAINUDEEN, M.; ROSNINA, Y. Hormônios, fatores de crescimento e reprodução. In: Hafez, E. e Hafez, B. (Ed.). **Reprodução animal**, 2004. v.7, p.33-54.

JAWOR, J. M.; MCGLOTHLIN, J. W.; CASTO, J. M.; GREIVES, T. J.; SNAJDR, E. A.; BENTLEY, G. E.; KETTERSON, E. D. Seasonal and individual variation in response to GnRH challenge in male dark-eyed juncos (*Junco hyemalis*). **General and comparative endocrinology**, v. 149, n. 2, p. 182-189, 2006.

JENSEN, T.; DURRANT, B. Assessment of reproductive status and ovulation in female brown kiwi (*Apteryx mantelli*) using fecal steroids and ovarian follicle size. **Zoo Biology**, v. 25, n. 1, p. 25-34, 2006.

JOHNSON, A. L. Reproduction in the Female. In: Whittow, G. C. (Ed.). **Sturkie's Avian Physiology (Fifth Edition)**. San Diego: Academic Press, 2000, p.569-596.

JOHNSON, A.; WOODS, D. C. Ovarian dynamics and follicle development. In: (Ed.). **Reproductive Biology and Phylogeny of Aves**, 2007, p.243-277.

JUNIPER, T.; PARR, M. **Parrots: a guide to parrots of the world**: A&C Black, 2003

KING, J. A.; MILLAR, R. P. Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. I. Structural determination on partially purified material. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 18, p. 10722-10728, 1982.

KING, J. A.; MILLAR, R. P. Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. II. Isolation and characterization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 18, p. 10729-10732, 1982.



KING, J. A.; MILLAR, R. P. Evolutionary aspects of gonadotropin-releasing hormone and its receptor. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 15, n. 1, p. 5-23, 1995.

MCNAUGHTON, F.; DAWSON, A.; GOLDSMITH, A. A comparison of the responses to gonadotrophin-releasing hormone of adult and juvenile, and photosensitive and photorefractory European starlings, *Sturnus vulgaris*. **General and comparative endocrinology**, v. 97, n. 1, p. 135-144, 1995.

MINOIA, P.; DE BENEDICTIS, G.; LACALANDRA, G.; LATERZA, V.; BUFO, P. Reproductive conditioning of the partridge (*Perdix perdix*) with GnRH and an increase in the photoperiod]. **Bollettino della Società italiana di biologia sperimentale**, v. 60, n. 6, p. 1153, 1984.

MIYAMOTO, K.; HASEGAWA, Y.; NOMURA, M.; IGARASHI, M.; KANGAWA, K.; MATSUO, H. Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 12, p. 3874-3878, 1984.

PEREIRA, R. J. G. Acompanhamento Endócrino e Comportamental da Atividade Reprodutiva Anual de Machos de Falcões Quiri-Quiri (*Falco Sparverius*) de Vida Livre. **Tese de Doutorado**, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, 2008.

PICKARD, A. Reproductive and welfare monitoring for the management of ex situ populations. In: (Ed.). **Conservation biology series-CAMBRIDGE-**, 2003, p.132-146.

POLLOCK, C. G.; OROSZ, S. E. Avian reproductive anatomy, physiology and endocrinology. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 5, n. 3, p. 441-474, 2002.

PROUDMAN, J.; FROMAN, D.; KIRBY, J. Reprodução em aves: Macho e fêmea. In: (Ed.). **Reprodução Animal. 7ª ed. Manole, Barueri.[Links]**, 2004, p.237-257.

RAMADORI, D.; BOLKOVIC, M. L. Manejo de fauna silvestre en la Argentina: programas de uso sustentable. v., n., p., 2006.

RITCHIE, M.; PILNY, A. A. The Anatomy and Physiology of the Avian Endocrine System. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2008.

ROBBE, D.; TODISCO, G.; GIAMMARINO, A.; PENNELLI, M.; MANERA, M. Use of a synthetic GnRH analog to induce reproductive activity in canaries (*Serinus canaria*). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 22, n. 2, p. 123-126, 2008.

SEIXAS, G.; MOURÃO, G.; GALETTI, M.; PIZO, M. Biologia reprodutiva do papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) no Pantanal sul-mato-grossense, Brasil. In: (Ed.). **Ecologia e Conservação de Psitacídeos no Brasil. Belo Horizonte, Melopsittacus Publicações Científicas**, 2002, p.157-171.

SEIXAS, G. H. F. Projeto Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*): Manejo e conservação no Pantanal e Cerrado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **PUBVET**, v. 1, n., p. 410, 2007.

SHARP, P.; CICCONE, N. The gonadotrophin releasing hormone neurone: key to avian reproductive function. In: (Ed.). **Functional Avian Endocrinology**, 2005, p.59-72.

SICK, H. **Ornitologia brasileira Ornitologia brasileira Ornitologia brasileira**, 1997 (Rio de Janeiro: Nova Fronteira)

SILVEIRA, L.; STRAUBE, F. Aves ameaçadas de extinção no Brasil. In: (Ed.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**, 2008. v.1,

SNYDER, N. F. **Parrots: Status Survey and Conservation Action Plan, 2000-2004**: IUCN, 2000, v.48

STALEY, A. M.; BLANCO, J. M.; DUFTY JR, A. M.; WILDT, D. E.; MONFORT, S. L. Fecal steroid monitoring for assessing gonadal and adrenal activity in the golden

eagle and peregrine falcon. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 177, n. 6, p. 609-622, 2007.

STERLING, R.; SHARP, P. A comparison of the luteinizing hormone-releasing activities of synthetic chicken luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH), synthetic porcine LH-RH, and Buserelin, and LH-RH analogue, in the domestic fowl. **General and comparative endocrinology**, v. 55, n. 3, p. 463-471, 1984.

THOMSEN, J.; BRAUTIGAM, A. Sustainable use of Neotropical parrots. In: (Ed.). **Neotropical wildlife use and conservation. The University of Chicago Press, Chicago**, 1991, p.359-379.

WASSER, S. K.; HUNT, K. E. Noninvasive measures of reproductive function and disturbance in the barred owl, great horned owl, and northern spotted owl. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 1, p. 109-137, 2005.

## CAPÍTULO 2 – Perfil Anual de Progestágenos e Andrógenos Urofecais de Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) em cativeiro.

**RESUMO** – A endocrinologia reprodutiva nas aves selvagens atualmente tem evoluído com o uso de monitoramento não-invasivo na descrição dos processos endócrinos envolvidos e dos perfis reprodutivos. Mesmo assim muitas espécies são carentes destes conhecimentos, dentre elas podemos citar os psitacídeos. Este trabalho teve como objetivo descrever os perfis endócrinos anuais dos esteroides sexuais urofecais em *Amazona aestiva* e sua utilização no aprimoramento do manejo reprodutivo da espécie. Utilizamos 10 casais adultos da espécie *Amazona aestiva* mantidos em viveiros suspensos, pertencentes ao Criadouro da Brisa, situado Jaboticabal/SP. As excretas foram coletadas ao menos uma vez por semana entre junho de 2011 e julho de 2012 para entendimento dos processos endócrinos que regem a reprodução da espécie. O monitoramento da atividade gonadal foi feita de forma não invasiva por mensuração de metabólitos de andrógenos nas excretas dos machos e de progestágenos nas excretas de fêmeas. Foram coletadas amostras frescas de excretas, sempre no período entre 14h as 17h, e mantidas congeladas até o processamento. As amostras foram secas em estufa a 57°C, trituradas e os hormônios extraídos utilizando metanol a 80%. A dosagem hormonal foi realizada no Laboratório de Endocrinologia do NUPECCE (Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos) utilizando ensaio imunoenzimático com o anticorpo para andrógenos e progestágenos. O perfil anual de andrógenos nas excretas de *Amazona aestiva* apresentou as seguintes médias mensais: janeiro 71,9±7,3 ng/g (n=40); fevereiro 109,1±8,1ng/g (n=46); março 79,1±7,4ng/g (n=36); abril 57,8±5,9ng/g (n=36); maio 63,5±8,2ng/g (n=42); junho 52,9±3,1ng/g (n=56); julho 60±3,6ng/g (n=65); agosto 89,7±3,3ng/g (n=175); setembro 84,3±2,6 (n=203); outubro 72,8±2,5ng/g (n=194); novembro 84±4ng/g (n=160); dezembro 72,7±5,4ng/g (n=54). No perfil anual de progestágenos nas excretas de *Amazona aestiva* foram as seguintes médias mensais: janeiro 11,3±0,9 ng/g (n=36); fevereiro 22,1±1,2/g (n=45); março 16,4±2ng/g (n=36); abril 7,4±0,5ng/g (n=36); maio 6,9±0,6ng/g (n=43); junho 8±0,7ng/g (n=57); julho 8,8±0,7ng/g (n=62); agosto 37,6±7,2ng/g (n=158); setembro 37,7±5,6 (n=185); outubro 57±16,5ng/g (n=181); novembro 24,1±1ng/g

(n=155); dezembro  $18,3 \pm 2$  ng/g (n=51). Os perfis apresentaram uma atividade hormonal maior durante a fase reprodutiva, com uma diferença entre as fêmeas que realizaram postura daquelas que não realizaram, porém sem diferença entre os machos férteis e inférteis. A endocrinologia reprodutiva demonstrou ser uma ferramenta para conhecimento da fisiologia e manejo reprodutivo da espécie.

**Palavras-chave:** psitacídeos, endocrinologia, reprodução, ensaio imunoenzimático.

## Introdução

O papagaio-verdadeiro é uma ave pertencente à família Psittacidae, ordem Psittaciformes. Possui uma ampla distribuição geográfica, ocupando o noroeste do Brasil, leste da Bolívia, norte da Argentina e sul do Paraguai (SICK, 1997). É classificada pela IUCN como “pouco preocupante” apesar de sua população estar em declínio no número de indivíduos, consequência da degradação ambiental de seu território e principalmente pela captura de filhotes para abastecer o comércio, em sua maioria de forma ilegal (SICK, 1997; BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2012). A produção de um maior número de filhotes em cativeiro por criadores comerciais e legais poderia atuar de forma indireta a este tráfico de animais selvagens, atuando indiretamente na preservação das espécies nativas.

O *Amazona aestiva* é popular como animal de estimação por sua beleza exuberante, inteligência e habilidade na imitação de voz humana. Por isso é um psitacídeo de grande representatividade em cativeiro, mas infelizmente isto não é proporcional ao conhecimento que se tem sobre a espécie, principalmente aos aspectos reprodutivos.

Sabe-se que é um papagaio de reprodução sazonal, com período reprodutivo entre julho e dezembro, de ciclo de postura único com dois a quatro ovos e incubação de 24 a 29 dias (SICK, 1997; SEIXAS, 2007). Entretanto, os dados relacionados à reprodução foram obtidos através de observações comportamentais, o que dificulta o entendimento dos mecanismos que regulam a reprodução e a implementação de técnicas reprodutivas. O estudo da fisiologia da reprodução nesta espécie pode ser um avanço fundamental para melhorar a manutenção e multiplicação em cativeiro.

Atualmente, o acesso a endocrinologia reprodutiva de aves selvagens tem se tornado mais frequente pela utilização do monitoramento endócrino não-invasivo utilizando as excretas na mensuração dos hormônios ligados a reprodução. Esta técnica permite a obtenção de dados fisiológicos sem influência de estresse pela ausência de necessidade de coleta de sangue, comum nas técnicas tradicionalmente aplicadas aos animais domésticos nas investigações dos processos hormonais.

Na ordem Psittaciformes a quantidade de informação a respeito da endocrinologia reprodutiva é limitada, resumindo-se principalmente a ensaios de tentativa de identificação de gênero e caracterização de excreção de metabólitos hormonais (LEE et al., 1997; DIAS & OLIVEIRA, 2006).

A regulação hormonal da reprodução nas aves acontece de maneira distinta aos mamíferos. A ocorrência da ovulação e da ovoposição são controladas por ações reprodutivas nas fêmeas envolvendo vários hormônios (UBUKA & BENTLEY, 2011). A diferença mais marcante está na função da progesterona, ela atua junto ao LH na indução da ovulação, sendo o LH indutor do crescimento dos folículos ovarianos, estes por sua vez produzem progesterona na camada da granulosa que tem efeito estimulatório na secreção de LH, assim este feedback positivo é alimentado até a ocorrência de picos de secreção de LH e progesterona que irão induzir a ovulação (JOHNSON, 2000; JOHNSON & WOODS, 2007; UBUKA & BENTLEY, 2011). Portanto, a mensuração dos níveis de progesterona é um bom parâmetro de atividade folicular nas fêmeas.

Nos machos o LH atuará sobre as células de Leydig, principal produtora de andrógenos. A testosterona nos machos é fundamental para espermatogênese, manutenção dos ductos deferentes e das características sexuais secundárias (JOHNSON, 2000).

Dentro desta perspectiva apresentada, o objetivo deste trabalho foi utilizar o monitoramento endócrino não invasivo de progestágenos e andrógenos urofecais em *Amazona aestiva* para aumentar o conhecimento à respeito da fisiologia da

reprodução da espécie e utilizá-lo como ferramenta no manejo reprodutivo em cativeiro.

## **Material e Métodos**

### Aves e Manejo

Este trabalho ocorreu de junho de 2011 à dezembro de 2012 e utilizou 10 casais e mais 2 machos de *A. aestiva* pertencentes ao Criadouro Comercial Brisa, devidamente legalizado no IBAMA (CTF 263703) e na Secretaria Estadual do Meio Ambiente de São Paulo (Autorização de Manejo 0000000024/2008-SP), situado em Jaboticabal, São Paulo, Brasil. Eram aves adultas, mantidas aos casais em gaiolas suspensas semi-cobertas (1m de largura X 1m de altura X 2m de comprimento) equipadas com ninho externo. Outros dois machos em gaiolas individuais também foram utilizados para o trabalho. A alimentação era composta por ração própria (batida e extrusada na propriedade) e água oferecidos *ad libitum* em recipientes automáticos.

As gaiolas suspensas eram numeradas de 1 a 10 e os papagaios foram identificados da mesma forma em cada gênero. No mês de dezembro de 2012 a fêmea 02 veio a óbito devido a um acidente e a mesma não foi substituída.

O manejo reprodutivo foi o de menor interferência possível, os casais permaneceram juntos durante todo período experimental, sem contato visual com outros casais. Por se tratar de um criadouro comercial, os filhotes nascidos eram retirados com aproximadamente 20 dias após o nascimento.

### Colheita das amostras de excretas nos casais

A colheita das amostras ocorreu nos dez casais durante junho de 2011 a junho de 2012, exceto nos casais 01, 04, 06, 08 e 09 que se estendeu até dezembro de 2012.

A colheita ocorria sempre no mesmo horário entre 14 e 17:30h e todas as excretas produzidas neste período eram depositadas em um mesmo recipiente para cada indivíduo, e depois congeladas até o processamento. A individualização da

amostra era possível por meio de uma divisória instalada na gaiola durante a colheita. Devido à característica das excretas da espécie, possuindo fezes e urinas misturadas, optou-se por colher toda a excreta.

A frequência de colheita era semanal, exceto para os casais em atividade reprodutiva como postura, incubação ou criação de filhotes que a frequência era diária sempre que possível.

#### Dados reprodutivos e meteorológicos

A atividade reprodutiva foi acompanhada de todos os casais por observação da ocorrência de postura, fertilidade ao décimo dia no exame de ovoscopia e eclosão.

Os dados meteorológicos também foram computados diariamente os valores de temperatura média, pluviosidade e comprimento do dia. Todos estes dados foram utilizados para relacionar os dados reprodutivos ao clima e sua implicação na sazonalidade reprodutiva observada na espécie. Os elementos meteorológicos utilizados neste trabalho, foram extraídos de um conjunto de dados pertencentes ao acervo da área de Agrometeorologia do Departamento de Ciências Exatas. As observações feitas na Estação Agroclimatológica do Campus de Jaboticabal (Latitude: 21°14'05" S; Longitude: 48°17' 09" W; Altitude: 615,01 m) são cotadas, digitadas em formato padronizado, realizada a consistência e controle de qualidade. Em seguida são obtidas as medias diárias, mensais e anuais que são repassadas aos usuários.

#### Dosagem Hormonal

A atividade gonadal foi monitorada por meio de mensuração dos metabólitos de esteroides sexuais na excretas dos machos (andrógenos) e das fêmeas (progestágenos). Todas as etapas da dosagem hormonal foram realizadas no laboratório de dosagem hormonal do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias câmpus de Jaboticabal (FCAV-UNESP).



## Processamento e Extração dos Metabólitos das Excretas

O protocolo de extração dos esteroides das excretas foi baseado na metodologia descrita por Tempel e Gutiérrez (2004). As excretas foram secas em estufa a 57°C por 72 horas e posteriormente trituradas. Para extração utilizou-se 0,1g de excreta seca em 2mL de metanol a 80%, este conteúdo foi agitado por vortex 30 segundos, agitador horizontal por 12 horas, e novamente em vortex por 30 segundos. Após estas etapas, o conteúdo foi centrifugado a 377g por 20 minutos, sendo o sobrenadante transferido para tubos novos e estocados à -20°C. Amostras de excretas secas que não apresentaram a quantidade suficiente para extração conforme o protocolo acima citado foram extraídas respeitando a proporção de metanol 80% ao peso do protocolo.

## Ensaio Imunoenzimático (EIA)

Os anticorpos utilizados foram o CL425 para progestágenos e o R156/7 para andrógenos, ambos provenientes da California University – DAVIS/CA – USA. A reação cruzada foi descrita por GRAHAM et al. (2001) como: 4-pregnen-3,20-diona (progesterona) 100,0%; 4-pregnen-3a-ol-20-ona 188,0%; 4-pregnen-3b-ol-20-ona 172,0%; 4-pregnen-11a-ol-3,20-diona 147,0%; 5a-pregnan-3b-ol-20-ona 94,0%; 5a-pregnan-3a-ol-20-ona 64,0%; 5a-pregnan-3,20-diona 55,0%; 5b-pregnan-3b-ol-20-ona 12,5%; 5b-pregnan-3,20-diona 8,0%; 4-pregnen-11b-ol-3,20-diona 2,7%; 5b-pregnan-3a-ol-20-ona 2,5%; 5b-pregnan-3a,20a-diol(pregnanediol) <0,1%; outros metabólitos <0,1%. Já a reatividade cruzada do anticorpo R156/7 foi descrita por POLEGATO (2004) como sendo: 100% para testosterona; 57.37% para 5B-dihidrotestosterona; 0.27% para androstenediona; 0.4% para androsterona; e <0,04% para todos os outros metabólitos analisados.

A escolha dos anticorpos ocorreu seguindo o princípio da validação do ensaio (GOYMANN, 2005), utilizando os testes descritos por Brown e colaboradores (2004) e também por Wasser e colaboradores (1995): paralelismo, dose-resposta e validação fisiológica. No teste de paralelismo, o pool de amostras apresentou um perfil semelhante ao da curva padrão durante sua diluição, gerando uma curva com disposição paralela a curva padrão nos dois anticorpos analisados e a proporção de diluição inicial de 1:8 tanto para progestágenos quanto para andrógenos. No teste de

dose-resposta, o acréscimo de hormônio exógeno obteve recuperação significativa nos dois anticorpos utilizados, gerando a curva  $y=0,803x - 4,2421$ ;  $R^2 = 0,988$  para CL425 e  $y=1,061x + 1,5923$ ;  $R^2 = 0,9905$  para R156/7, ambos dentro do intervalo aceitável para validação (entre 0,8 a 1,0). Já a validação fisiológica foi feita de maneira diferente para os dois anticorpos.

A validação fisiológica do anticorpo R156/7 para as excretas de macho foi feita através de desafio hormonal por aplicação de agonista sintético de GnRH, acetato de buserelina (Conceptal®, Intervet, Cotia, Brasil), seguindo a dose de  $8\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso vivo (LOVAS et al., 2010). Dois machos adultos de *A.aestiva* (Macho A e Macho B) tiveram suas amostras de excretas colhidas a cada 12 horas por três dias, após isto receberam a aplicação intramuscular do Conceptal® e a partir deste momento colheu-se as excretas a cada 4 horas por 72 horas (LEE et al., 1999). Mensurado os metabólitos de andrógenos nestas amostras com anticorpo R156/7 foi possível constatar um aumento de três vezes nos níveis de andrógenos após 4 horas da aplicação no macho A e duas vezes após 8 horas no macho B. Isso caracterizou a validação fisiológica do anticorpo R156/7 para mensuração de metabólitos de andrógenos em excretas de *Amazona aestiva* machos.

Nas fêmeas não se adotou a mesma técnica para validação fisiológica pois o uso de agonista de GnRH só surtiria efeito no caso de folículos ovarianos ativos, caso isso não estivesse ocorrendo poderia gerar um resultado falso. Optou-se pela realização da técnica de controle negativo utilizando amostras de duas fêmeas, colhidas durante o período de postura, esperando oscilação nos níveis de progestágenos como descrito para espécies domésticas. Mensurados os metabólitos de progestágenos com o anticorpo CL425, foram observadas oscilações expressivas durante o período de postura nas duas fêmeas analisadas, caracterizadas por um aumento nos níveis de progestágenos no dia anterior a postura com subsequente queda, sendo observado um novo aumento até o próximo ovo. Esta oscilação coincide com que comumente foi relatado nas aves domésticas, nas quais o aumento da atividade folicular desencadeada durante a postura, aumenta a produção de progesterona, validando então o anticorpo CL425 para mensuração dos metabólitos de progestágenos em *Amazona aestiva* fêmeas.

Os mesmos ensaios foram utilizados na dosagem hormonal das amostras deste trabalho, uma vez que os testes de validação demonstraram que eles são acurados, precisos e confiáveis. Também foram utilizados como controle de qualidade interna os coeficientes de variação intra (menores que 10%) e inter-ensaios baixos (Progestágenos: controle alto 9,1% na ligação e 14,8% na concentração, e controle baixo 9,3% na ligação e 14,0% na concentração; Andrógenos: controle alto 7,8% na ligação e 13,8% na concentração, e controle baixo 5,2% na ligação e 14,5% na concentração), que asseguram a repetitividade e comparação dos dados obtidos por estes EIAs.

#### Compilação dos resultados e Análise estatística

Os níveis dos esteroides sexuais são apresentados em nanogramas de hormônio por grama de excretas secas (ng/g).

Os dados estão apresentados como médias mensais  $\pm$  Erro Padrão da Média(EPM). A comparação entre os diferentes meses foi realizado com o uso de análise de variância de medidas repetidas, seguido pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Também foi realizada uma comparação entre os indivíduos que tiveram atividade reprodutiva e aqueles que não tiveram, nomeados como reprodutores e não reprodutores. Considerou-se como machos reprodutores os indivíduos que produziram filhotes e não-reprodutores os indivíduos para os quais as fêmeas botaram, porém os ovos não foram fertilizados. Já nos caso das fêmeas foram consideradas reprodutoras as fêmeas que realizaram postura e não-reprodutoras as que não realizaram postura. Foram comparadas as médias semanais pela análise de variância seguido pelo teste f ( $p < 0,05$ ).

Foi realizada a correlação de Pearson entre os níveis hormonais encontrados e temperatura, horas de luz por dia e pluviosidade.

Todas as análises foram feitas com o programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) e os dados sofreram transformação logarítmica.

## **Resultados**

### **Dados Reprodutivos**

No ano de 2011, primeiro ano de experimento, cinco casais apresentaram atividades reprodutivas, realizando sete ciclos de postura, produzindo um total de 22 ovos e o nascimento de apenas seis filhotes. Os casais 01, 03 e 09 foram aqueles que produziram filhotes no ano e os casais 05 e 06 os que realizaram somente a postura de ovos inférteis. Na tabela 1 é possível visualizar um resumo das atividades reprodutivas ocorridas no ano 2011.

Algumas fêmeas apresentaram o comportamento de permanecer integralmente no ninho, com saídas muito rápidas somente quando não haviam pessoas próximas. Esse comportamento impossibilitou a visualização diária da oviposição, impedindo a determinação do dia exato da postura, por exemplo, do segundo ovo do casal 03 e terceiro do casal 09.

O primeiro filhote nascido do casal 03 foi encontrado morto no dia seguinte ao seu nascimento, com evidências de mutilações realizadas pelos pais. Este comportamento é frequentemente associado à inexperiência dos casais. O segundo filhote desse casal foi criado normalmente, podendo indicar o aprendizado reprodutivo do casal. Todos os filhotes sobreviventes próximos de 15 dias de idade foram retirados dos ninhos para comercialização.

Os casais 05 e 06 realizaram dois ciclos de posturas cada um, porém somente de ovos inférteis. Mesmo constatando que os ovos estavam inférteis, eles não foram retirados do ninho, com vistas ao entendimento do comportamento de abandono do ninho dos casais e os perfis hormonais envolvidos nele. Após um período extenso de incubação, as fêmeas abandonaram o ninho e somente neste momento foram retirados os ovos. Logo após o abandono do ninho por estes dois casais houve uma segunda postura, fato que não é comum na reprodução em cativeiro de papagaio-verdadeiro.

Tabela 1 – Atividades reprodutivas ocorridas em 2011 nos casais de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) do presente estudo.

Casais	Data de Postura*	Data de Eclosão**	Tempo de Incubação**	Abandono do ninho
01	17/08/11	11/09/11	26 dias	---
	20/08/11	15/09/11	27 dias	---
	25/08/11	17/09/11	24 dias	---
03	02/10/11	26/10/11	25 dias	---
	08/10/11	31/10/11	24 dias	---
	08/10/11	Não houve	---	---
05	05/08/11	Não houve	---	
	10/08/11	Não houve	---	22/09/11
	12/08/11	Não houve	---	49 dias
	15/08/11	Não houve	---	
	07/10/11	Não houve	---	
	08/10/11	Não houve	---	16/11/11
	12/10/11	Não houve	---	41 dias
06	15/10/11	Não houve	---	
	04/08/11	Não houve	---	22/09/11
	11/08/11	Não houve	---	50 dias
	08/10/11	Não houve	---	
	09/10/11	Não houve	---	11/11/11
09	13/10/11	Não houve	---	35 dias
	15/10/11	10/11/11	27 dias	---
	18/10/11	14/11/11	28 dias	---
	26/10/11	Não houve	---	---

\*Data provável a partir da primeira visualização do ovo

\*\*Considerando que a ordem de nascimentos dos ovos seja correspondente a mesma ordem da postura

Resumindo, 50% dos casais participantes do experimento apresentaram atividade reprodutiva no ano de 2011. Em média cada casal botou 3,14 ovos por postura, com um índice de fertilidade de 31,8%. Analisando somente os casais que produziram filhotes, a fertilidade dos ovos aumenta para 77,8%. Dentre os ovos férteis, 100% eclodiram, com um índice de sobrevivência dos filhotes de 85,7%. Podemos observar também que a média de incubação foi de 25,5 dias até o nascimento e no caso dos ovos estarem inférteis, o abandono ocorre em média aos 49,5 dias em ovos da primeira postura e 38 dias da segunda postura.

Os outros casais, apesar de não oviporem, também demonstraram comportamentos relacionados à reprodução. Todos os casais prepararam o ninho

para postura, roendo os tocos presentes dentro do ninho até uma granulometria fina. Foi possível também observar o comportamento de alimentação da fêmea pelo macho, cortejo e cópula em todos os casais. Além disso, as fêmeas pertencentes aos casais 07 e 10 permaneceram dentro do ninho, apresentando um comportamento compatível ao início de postura, mas não a realizaram.

No ano de 2012, cinco casais estiveram em atividade reprodutiva, realizando cinco ciclos de postura, produzindo um total de 14 ovos e nascimento de apenas quatro filhotes. Na tabela 2 é possível visualizar um resumo das atividades reprodutivas ocorridas no ano 2012.

Apesar de não ter eclodido, o segundo ovo do casal 04 apresentou-se fértil na ovoscopia aos 10 dias, sendo a única perda de um ovo fértil, dentre todos botados.

Resumindo, no ano de 2012, cinco dos cinco casais apresentaram atividade reprodutiva (100%). Em média, cada casal botou 2,8 ovos, com índice de 28,6% de fertilidade. Analisando somente os casais que produziram filhotes, a fertilidade atingiu 55,5%. A média de tempo de incubação foi de 29 dias e nos casais que apenas botaram ovos inférteis, a média de tempo de abandono do ninho foi 51,5 dias.

#### Dados meteorológicos

Os dados meteorológicos estão apresentados na figura 1. Os níveis de progesterona nas fêmeas apresentaram uma fraca correlação com a quantidade de horas de luz por dia (coeficiente igual a 0,18), com a temperatura média diária (coeficiente igual a 0,29) e com a quantidade diária de chuva (coeficiente igual a 0,08). Da mesma forma, os andrógenos nos machos também apresentaram fraca correlação com a quantidade de horas de luz por dia (coeficiente igual a -0,01), com a temperatura média diária (coeficiente igual a 0,25) e com a quantidade diária de chuva (coeficiente igual a -0,26).

#### Dosagens Hormonais

Para a apresentação do perfil anual de andrógenos nas excretas de *Amazona aestiva* foram utilizadas 1107 amostras e, sendo  $n$  o número de amostras por mês, foram obtidas as seguintes médias mensais: janeiro  $71,9 \pm 7,3$  ng/g ( $n=40$ ); fevereiro

109,1±8,1ng/g (n=46); março 79,1±7,4ng/g (n=36); abril 57,8±5,9ng/g (n=36); maio 63,5±8,2ng/g (n=42); junho 52,9±3,1ng/g (n=56); julho 60±3,6ng/g (n=65); agosto 89,7±3,3ng/g (n=175); setembro 84,3±2,6 (n=203); outubro 72,8±2,5ng/g (n=194); novembro 84±4ng/g (n=160); dezembro 72,7±5,4ng/g (n=54). Utilizando o mês de maior nível de andrógenos como base, fevereiro, só não há diferença significativa na análise estatística para março e agosto. Na figura 2 temos apresentação das médias durante todo o período de estudo.

Tabela 2 - Atividades reprodutivas ocorridas em 2012 nos casais de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) do presente estudo.

Casais	Data de Postura*	Data de Eclosão**	Tempo de Incubação**	Abandono do ninho
01	13/08/12	Não houve	---	12/10/12
	17/08/12	Não houve	---	61 dias
	20/08/12	Não houve	---	
04	19/09/12	17/10/12	30 dias	---
	22/09/12	Não houve	---	---
	25/09/12***	Não houve	---	---
06	05/09/12	02/10/12	28 dias	---
	09/09/12	Não houve	---	---
	12/09/12	Não houve	---	---
08	31/08/12	28/09/12	29 dias	---
	02/09/12	30/09/12	29 dias	---
	07/09/12	Não houve	---	---
09	28/09/12	Não houve	---	08/11/12
	02/10/12	Não houve	---	42dias

\*Data provável a partir da primeira visualização do ovo; \*\*Considerando que a ordem de nascimentos dos ovos seja correspondente a mesma ordem da postura; \*\*\* Ovo encontrado no chão do viveiro. Provável postura fora do ninho;

Para o perfil anual de progestágenos nas excretas de *Amazona aestiva* foram utilizadas 1045 amostras, com as seguintes médias mensais: janeiro 11,3±0,9 ng/g (n=36); fevereiro 22,1±1,2/g (n=45); março 16,4±2ng/g (n=36); abril 7,4±0,5ng/g (n=36); maio 6,9±0,6ng/g (n=43); junho 8±0,7ng/g (n=57); julho 8,8±0,7ng/g (n=62); agosto 37,6±7,2ng/g (n=158); setembro 37,7±5,6 (n=185); outubro 57±16,5ng/g (n=181); novembro 24,1±1ng/g (n=155); dezembro 18,3±2ng/g (n=51). Utilizando o mês de maior nível de progestágenos como base, outubro, há diferença significativa

com janeiro, abril, maio, junho e julho. Na figura 3 temos apresentação das médias durante todo o período de estudo.

No intuito de explorar as mensurações hormonais de forma mais ampla, foi realizada a comparação semanal entre casais reprodutores e não-reprodutores, sendo que os níveis de andrógenos (Figura 4) não diferiram significativamente e os níveis de progestágenos (Figura 5) diferiram significativamente entre as reprodutoras e não-reprodutoras na primeira semana de outubro apenas.



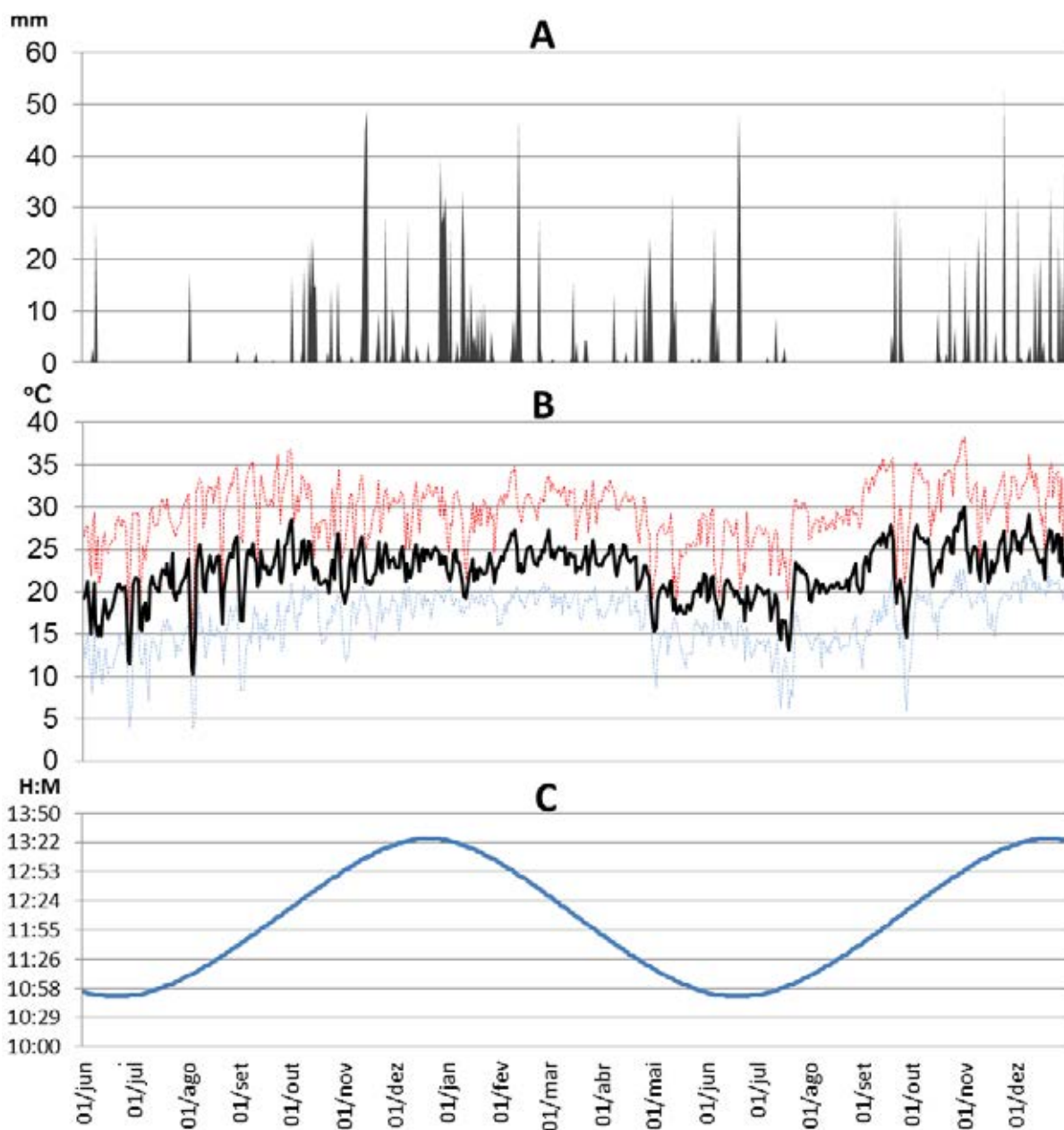


Figura 1 - Dados meteorológicos de junho de 2011 a dezembro de 2012. (A) Índice de Pluviosidade. (B) Temperatura máxima(vermelha), média(preta) e mínima(azul) diária. (C) Quantidade de horas e minutos de luz por dia.

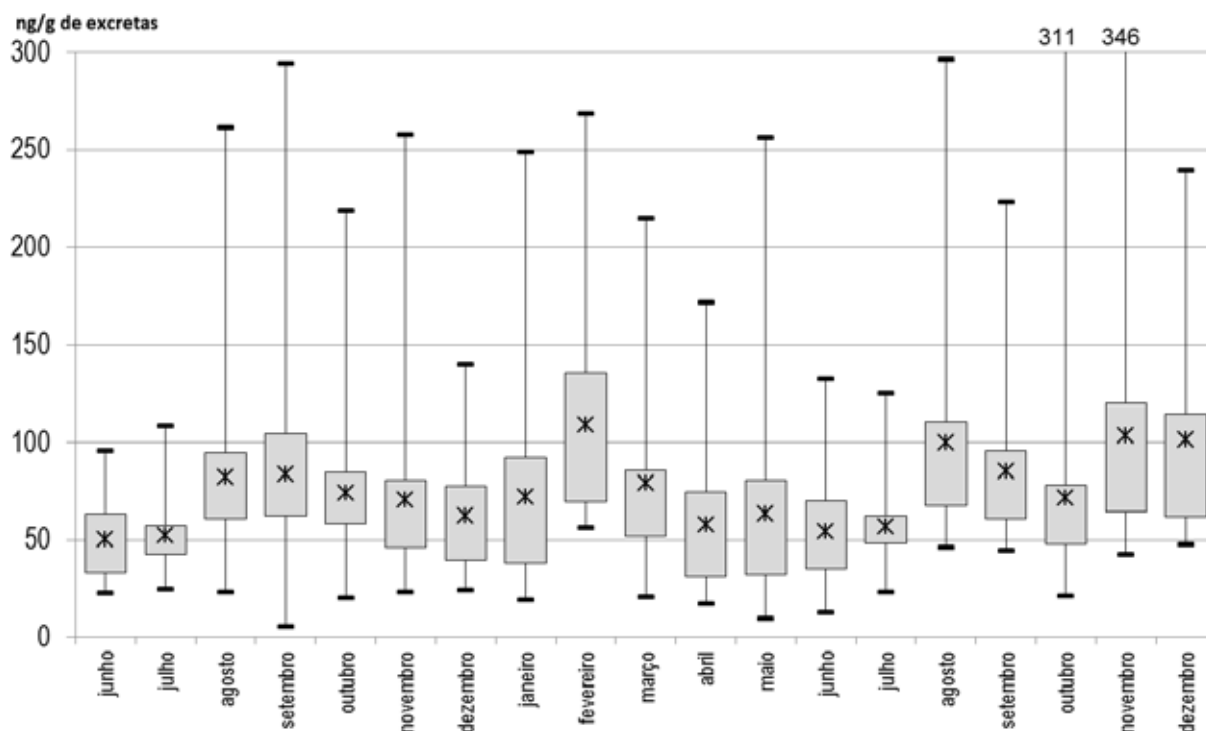


Figura 2 - Box-plot dos níveis de andrógenos urofecais de machos de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) no período entre junho de 2011 e dezembro de 2012. (x) Médias

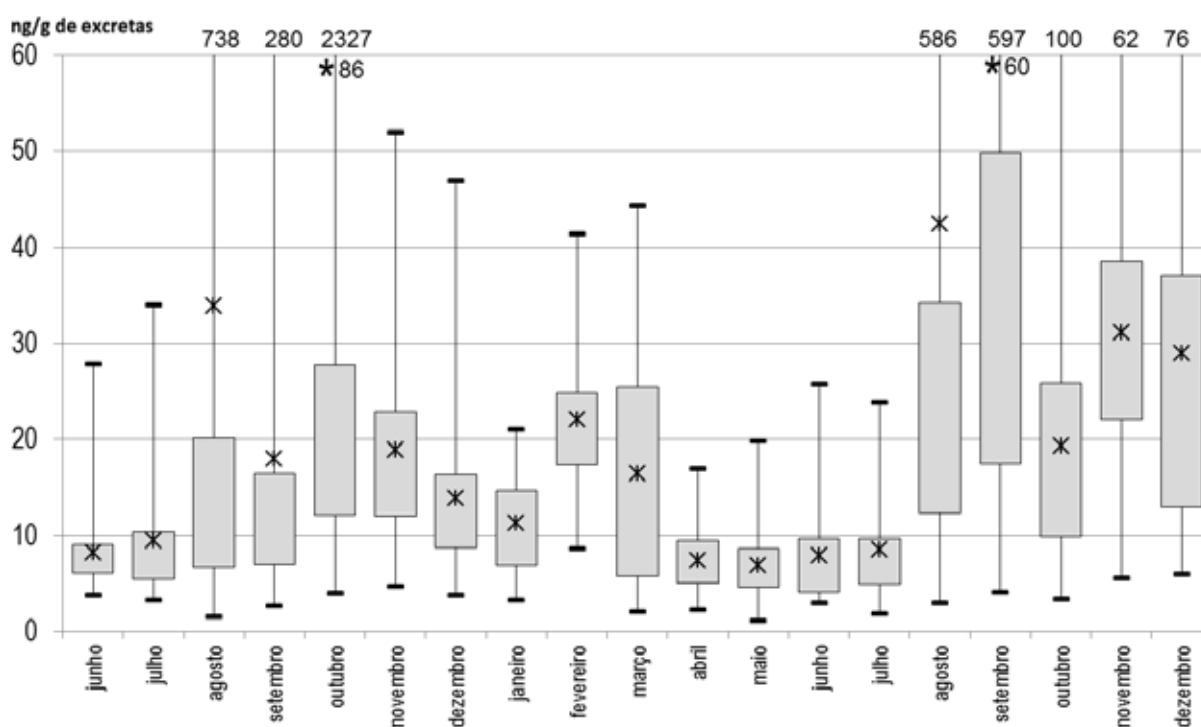


Figura 3 - Box-plot dos níveis de progestágenos urofecais de fêmeas de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) no período entre junho de 2011 e dezembro de 2012. (x) Médias

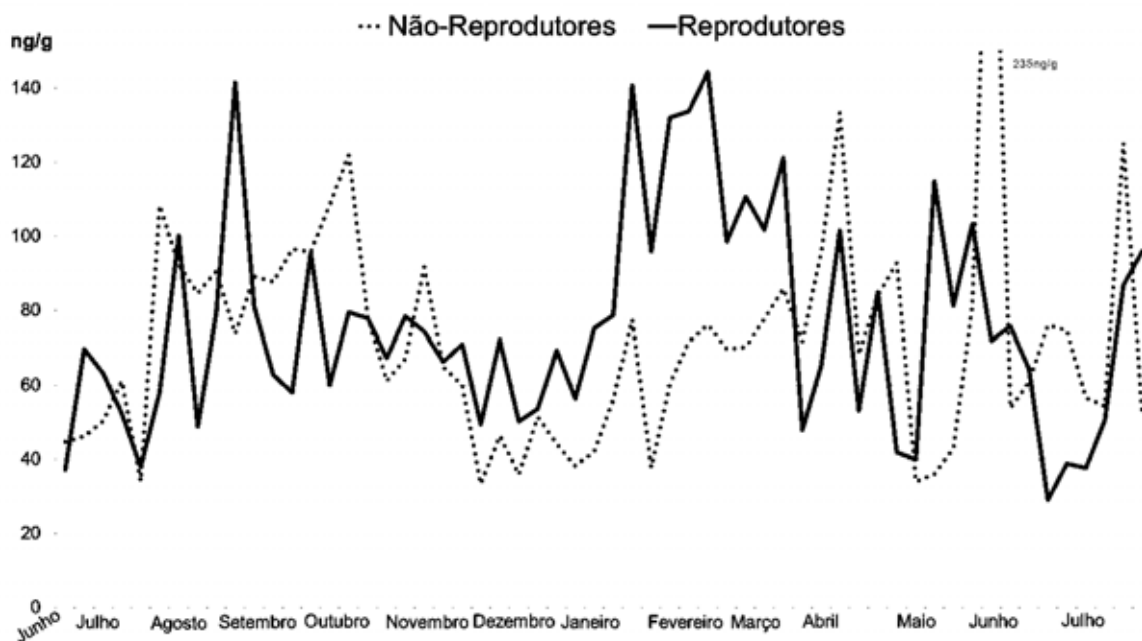


Figura 4 - Concentrações médias semanais de andrógenos dos machos reprodutores e não-reprodutores de Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) no período de junho de 2011 a julho de 2012.

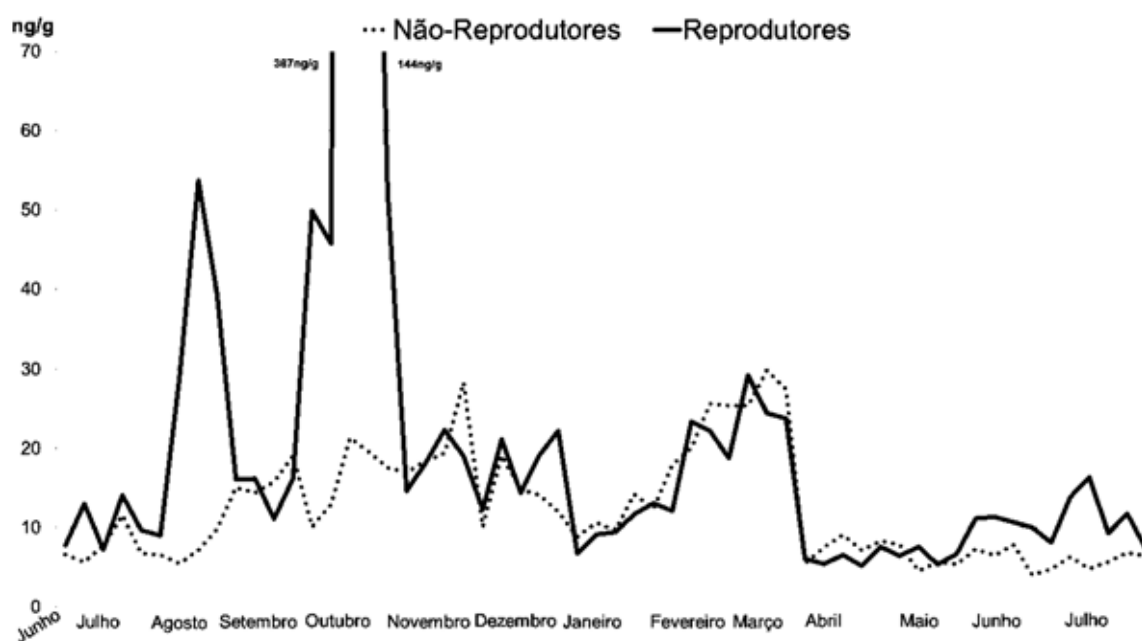


Figura 5- Concentrações médias semanais de progestágenos das fêmeas reprodutoras e não-reprodutoras de Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) no período de junho de 2011 a julho de 2012.

## Discussão

A reprodução de papagaio-verdadeiro (*A. aestiva*) em cativeiro acompanhada durante este trabalho produziu sete filhotes no primeiro ano e quatro no segundo, em uma proporção de 0,7 e 0,8 filhotes por casal, respectivamente em cada ano. Podemos avaliar esta proporção de baixo sucesso, levando em consideração que esta espécie pode botar até cinco ovos por temporada reprodutiva cada casal (FRANCISO & MOREIRA, 2012), o que evidencia a necessidade de aprimoramento no manejo reprodutivo da espécie em cativeiro. Isso fica claro quando analisamos os índices reprodutivos no primeiro ano experimental quando os sete filhotes foram produzidos apenas por três casais, e usando estes como base, os dez casais poderiam ter produzido uma média de 23 filhotes, se os sete casais não tivessem falhado.

O aprimoramento do manejo reprodutivo pode ter seu princípio na análise dos valores das dosagens hormonais obtidas neste trabalho.

Nos machos o perfil anual de andrógenos demonstrou duas épocas de elevação hormonal (entre julho e agosto e entre janeiro e fevereiro). Os níveis aumentaram quase 50% de julho para agosto, período que coincide com o início da época reprodutiva da espécie. Isso ocorre provavelmente pelo aumento na atividade de espermatogênese, desenvolvimento das estruturas testiculares e do comportamento reprodutivo que são estimulados pela testosterona (KIRBY & FROMAN, 2000). Essa flutuação entre o período pré-reprodutivo e reprodutivo já foi descrita em outras espécies de aves (BHAVNA et al., 2010) e pode ser reflexo do aumento da quantidade de horas de luz observados a partir de 21 de junho (solstício de inverno), mostrando a sensibilidade da espécie a alteração do fotoperíodo como estímulo ao início das atividades reprodutivas, também relatadas em outras espécies (DEVICHE et al., 2011). Podemos considerar este fator como uma possibilidade de manejo reprodutivo em cativeiro para estimular a reprodução, necessitando de maiores estudos a respeito.

Os níveis de testosterona estão positivamente relacionados à massa testicular e produção espermática (GARAMSZEGI et al., 2005), portanto esperávamos que os machos que fertilizaram ovos possuísem maiores níveis de andrógenos do que

aqueles que não fertilizaram. Porém podemos verificar na figura 4 que eles possuem um perfil muito semelhante durante o período reprodutivo, exceto em meados de setembro.

O tempo para ocorrência da espermatogênese completa nas aves domésticas é de 13 dias (DEVICHE et al., 2011) e este dado é desconhecido nos psitacídeos. No intuito de identificarmos o nível mínimo de andrógenos existente nos machos que fertilizaram ovos, fizemos um perfil dos machos nos 30 dias anteriores a postura dos ovos nos machos reprodutores e não-reprodutores (Figura 6). Nestes perfis foi possível detectar que os machos que fertilizaram ovos apresentaram o nível mínimo de 37,9ng/g de andrógenos urofecais durante este período pré-postura e que todos os machos que não fertilizaram ovos, apresentaram níveis maiores do que este em algum momento neste período. Fato também observado na comparação das médias. Isto indica que o problema de fertilidade nos ovos de *A. aestiva* em cativeiro não está relacionado à atividade gonadal nos machos, e sim a outros fatores como compatibilidade dos casais, comportamento reprodutivo e falha durante a cópula. Além disso, podemos considerar os machos durante o período de pré-reprodução com níveis de andrógenos urofecais superiores a 37,9ng/g como machos com potencial de reprodução, usando a mensuração hormonal não-invasiva como ferramenta na seleção de machos aptos a reproduzir.

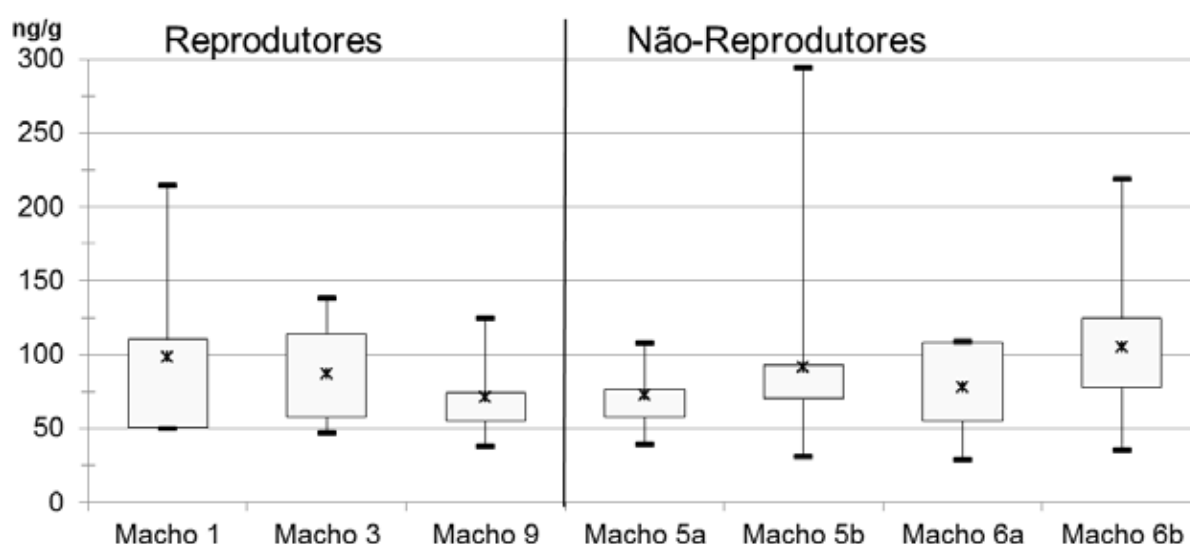


Figura 6 - Box-plot dos níveis de andrógenos urofecais de machos de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) no período de 30 dias anteriores a postura. (x) Médias.

A outra oscilação nos andrógenos urofecais observada nos machos foi entre janeiro e fevereiro, sendo os valores médios alcançados em fevereiro, os mais altos do ano. Esse aumento coincide com o período no qual foi observada a ocorrência de muda na maioria dos casais, e Péczely (1992) descreveu um aumento nos níveis de testosterona em aves no período final da muda e processo de diferenciação das estruturas da pena, porém os mecanismos pelos quais a testosterona está envolvida não estão claros. Como no nosso trabalho a observação da ocorrência da muda não foi computada de forma individual. Seria fundamental a realização de estudos nesta época para verificar se há atividade gonadal com aptidão reprodutiva ou se este aumento apenas está relacionado à muda.

O perfil de progestágenos urofecais nas fêmeas de *A. aestiva* apresentou aumento nos níveis hormonais nos meses de agosto, setembro e outubro comparado aos outros meses no ano. Estes meses coincidem com os meses reprodutivos, nos quais ocorreram postura e os valores de progestágenos durante este período alcançaram níveis até 50 vezes maiores do que o valor mais alto dos outros meses. Podemos associar este aumento na secreção de progestágenos com o crescimento dos folículos ovarianos, estimulados pela secreção de LH, que assim como nos machos, deve ter sua secreção influenciada pelo início do aumento de horas de luz diária.

Este aumento durante a postura também já foi observado em outras aves selvagens (JENSEN & DURRANT, 2006; BHAVNA et al., 2010) e no monitoramento endócrino em aves domésticas foi descrito que a secreção de progesterona aumenta conforme o crescimento dos folículos pré-ovulatórios e alcança níveis máximos de 6 a 8 horas antes da ovulação, seguido de queda e depois novo aumento na postura de cada ovo (JOHNSON, 2000). Na figura 7 podemos observar o perfil de progestágenos urofecais de *A. aestiva* durante o período anterior e durante o ciclo de postura das cinco fêmeas no ano de 2012. Neste perfil é identificada a oscilação dos níveis de progestágenos a cada ovoposição, e diminuição dos picos a cada postura, devido a diminuição da quantidade de folículos pré-ovulatórios e, conseqüentemente, diminuindo a capacidade secretória de progesterona.

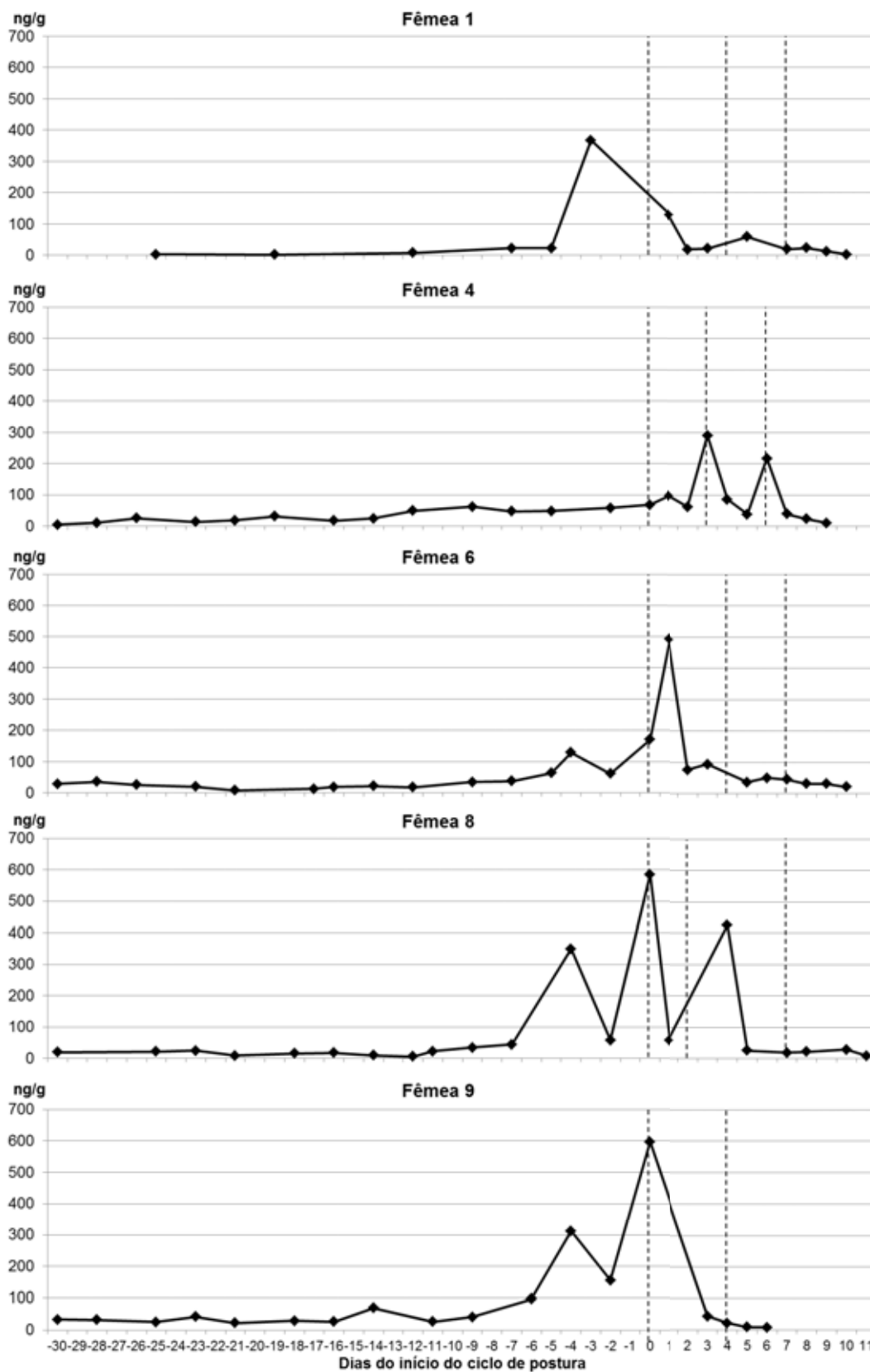


Figura 7 - Perfil de progestágenos urofecais em fêmeas de *Amazona aestiva* durante o ciclo de postura. As linhas pontilhadas indicam os dias de ocorrência de ovoposição.

Em busca da detecção de um nível de progesterona urofeca característico às fêmeas com potencial reprodutivo, classificamos cada amostra no período de março a dezembro, em três fases: postura (amostras colhidas durante o ciclo de postura), pré-postura (amostras colhidas durante as duas semanas anteriores ao início do ciclo de postura) e fora de postura (todas as outras amostras que não foram classificadas nas outras fases). Classificadas, fizemos a contagem da quantidade de amostras a cada cinco nanogramas de progesteronas por grama de excreta seca para cada classe (Figura 8).

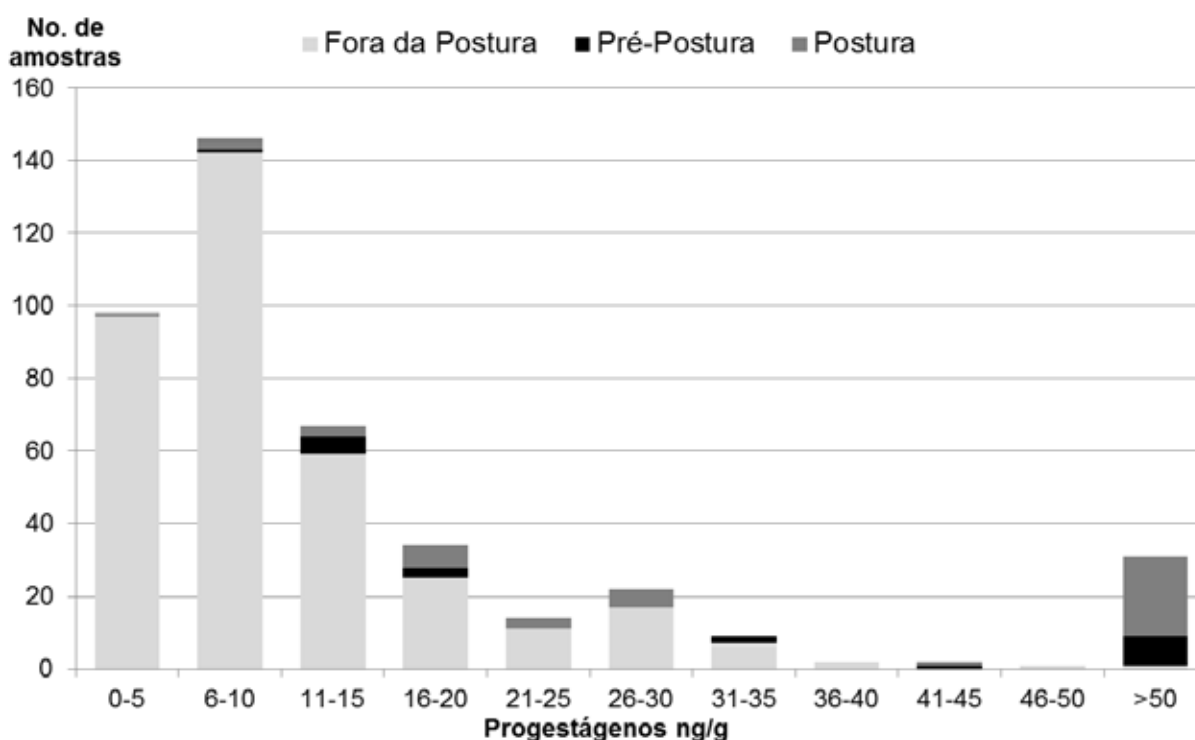


Figura 8 - Números de amostras por intervalo de níveis de progesterona urofeca de fêmeas de *Amazona aestiva* classificadas conforme época reprodutiva.

Esta classificação permitiu verificar que na classe fora de postura apenas 2 (0,46%) amostras dentre 426 alcançaram níveis superiores a 40ng/g e 16 (3,75%) amostras dentre 426 tiveram níveis inferiores a 40ng/g nas classes pré-postura e postura, sendo assim, podemos utilizar a dosagem hormonal de progesterona urofeca em fêmeas de *A. aestiva* durante o período pré-reprodutivo e aquelas que apresentarem níveis superiores a 40 ng/g possuem um grande potencial de realização de postura. Porém 55% das amostras na pré-postura e 48% na postura



tiveram níveis inferiores a 40 ng/g, portanto não podemos classificar de forma negativa as fêmeas que apresentarem níveis inferiores a 40ng/g durante o período pré-reprodução. A mensuração de progesteronas urofecais em fêmeas de *Amazona aestiva* durante o período reprodutivo pode ser utilizado como uma ferramenta na escolha de matrizes para inseminação artificial, uma vez que aquelas que apresentarem níveis superiores a 40ng/g estarão muito próximas do início do ciclo de postura.

Muitos fatores podem ser responsáveis pela sazonalidade reprodutiva nas aves (UBUKA & BENTLEY, 2011) e no *Amazona aestiva* não parece ser diferente. A quantidade horas de luz diária parece ser determinante no início do desenvolvimento gonadal tanto de machos quanto de fêmeas de *A. aestiva* pela proximidade temporal do aumento dos níveis hormonais e do aumento do tempo de luz. Esta relação é interrompida no mês de dezembro, quando é possível observar uma queda nos níveis hormonais mesmo quando ainda ocorre aumento no tempo de horas de luz diárias. Podemos então associar esta época com o período de fotorefratariedade da espécie, que também pode ser influenciada pelo aumento da intensidade e frequência das chuvas. Entretanto são necessários estudos mais específicos para o melhor entendimento da sazonalidade reprodutiva do *Amazona aestiva*.

Concluimos neste trabalho que a mensuração hormonal não-invasiva utilizando as excretas de *Amazona aestiva* foi uma técnica adequada para descrição do perfil anual dos estereóides sexuais na espécie e pode ser utilizada como ferramenta no manejo reprodutivo da espécie, na identificação de machos aptos a reprodução e fêmeas com potencial reprodutivo. Também que a espécie necessita de maiores estudos em cativeiro no pareamento das matrizes reprodutoras no intuito de aperfeiçoar e elevar a reprodução, pois os perfis hormonais das matrizes que não obtiveram sucesso reprodutivo em nosso trabalho foram em sua maioria semelhantes as que obtiveram sucesso.

## Referências Bibliográficas

BHAVNA, B.; SAPNA, S.; GEETA, P. Seasonal Fluctuation in Concentration of Progesterone and Testosterone in Three Avian Species-*Acridotheres ginginianus* (Sturnidae), *Sturnus pagodarum* (Sturnidae) and *Turdoides striatus* (Muscicapidae), with Diverse Breeding Strategies. **ACTA ZOOLOGICA BULGARICA**, v. 62, n. 3, p. 339-350, 2010.

BIRDLIFE INTERNATIONAL 2012. *Amazona aestiva*. In: IUCN 2013. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2013.1. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 11 September 2013

BROWN, J.; WALKER, S.; STEINMAN, K. Endocrine manual for reproductive assessment of domestic and non-domestic species. In: Conservation and Research Center, Smithsonian's National Zoological Park Endocrine Workshop on Reproductive Assessment of Domestic and Non-domestic Species. Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand, 2004, p. 53-55.

DEVICHE, P.; HURLEY, L. L.; FOKIDIS, H. B. Avian testicular structure, function, and regulation. In: (Ed.). **Hormones and reproduction in vertebrates**, 2011. v.4, p.27-69.

DIAS, E. A.; OLIVEIRA, C. A. D. Determinação do sexo de psitacídeos por radioimunoensaio (RIE) de esteróides sexuais a partir de excretas cloacais; Psittacine sex determination by radioimunoassay (RIA) of sex steroids using fecal samples. **Braz. j. vet. res. anim. sci**, v. 43, n. supl, p. 5-11, 2006.

FRANCISCO, L.; MOREIRA, N. Manejo, reprodução e conservação de psitacídeos brasileiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 4, p. 215-219, 2012.

GALAMA, W. T.; GRAHAM, L. H.; SAVAGE, A. Comparison of fecal storage methods for steroid analysis in black rhinoceroses (*Diceros bicornis*). **Zoo Biology**, v. 23, n. 4, p. 291-300, 2004.

GARAMSZEGI, L.; EENS, M.; HURTREZ-BOUSSES, S.; MØLLER, A. Testosterone, testes size, and mating success in birds: a comparative study. **Hormones and Behavior**, v. 47, n. 4, p. 389-409, 2005.

GOYMANN, W. Noninvasive monitoring of hormones in bird droppings: physiological validation, sampling, extraction, sex differences, and the influence of diet on hormone metabolite levels. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 1, p. 35-53, 2005.

GRAHAM, L.; SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; GALAMA, W.; SAVAGE, A. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum. **Zoo Biology**, v. 20, n. 3, p. 227-236, 2001.

JENSEN, T.; DURRANT, B. Assessment of reproductive status and ovulation in female brown kiwi (*Apteryx mantelli*) using fecal steroids and ovarian follicle size. **Zoo Biology**, v. 25, n. 1, p. 25-34, 2006.

JOHNSON, A. L. Chapter 22 - Reproduction in the Female. In: Whittow, G. C. (Ed.). **Sturkie's Avian Physiology (Fifth Edition)**. San Diego: Academic Press, 2000, p.569-596.

JOHNSON, A.; WOODS, D. C. Ovarian dynamics and follicle development. In: (Ed.). **Reproductive Biology and Phylogeny of Aves**, 2007, p.243-277.

KIRBY, J.; FROMAN, D. Reproduction in male birds. In: (Ed.). **Sturkie's avian physiology**, 2000, p.597-615.

LEE, J.; TELL, L.; LASLEY, B. A comparison of sex steroid hormone excretion and metabolism by psittacine species. **Zoo Biology**, v. 18, n. 4, p. 247-260, 1999.

LOVAS, E.; JOHNSTON, S.; FILIPPICH, L. Using a GnRH agonist to obtain an index of testosterone secretory capacity in the cockatiel (*Nymphicus hollandicus*) and sulphur-crested cockatoo (*Cacatua galerita*). **Australian veterinary journal**, v. 88, n. 1-2, p. 52-56, 2010.

PECZELY, P. Hormonal regulation of feather development and moult on the level of feather follicles. **Ornis Scandinavica**, v., n., p. 346-354, 1992.

POLEGATO, B. F. Validação de método endócrino não-invasivo para monitoramento de fisiologia reprodutiva e de atividade dos glicocorticóides em cervídeos neotropicais. 2004. 43 f. **Monografia** (Trabalho de graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

SEIXAS, G. H. F. Projeto Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*): Manejo e conservação no Pantanal e Cerrado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **PUBVET**, v. 1, n., p. 410, 2007.

SICK, H. **Ornitologia brasileira Ornitologia brasileira Ornitologia brasileira**, 1997 (Rio de Janeiro: Nova Fronteira)

TEMPEL, D. J.; GUTIÉRREZ, R. Factors related to fecal corticosterone levels in California spotted owls: implications for assessing chronic stress. **Conservation Biology**, v. 18, n. 2, p. 538-547, 2004.

UBUKA, T.; BENTLEY, G. E. Neuroendocrine control of reproduction in birds. In: (Ed.). **Hormones and Reproduction of Vertebrates: Birds**, 2011, p.1-25.

WASSER, S. K.; VELLOSO, A. D. L.; RODDEN, M. D. Using fecal steroids to evaluate reproductive function in female maned wolves. **The Journal of wildlife management**, v., n., p. 889-894, 1995.

### **CAPÍTULO 3 – Efeito do uso de análogo de GnRH de liberação lenta na reprodução em cativeiro de Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*)**

**RESUMO** – A manipulação hormonal para a estimulação da reprodução tem progredido como ferramenta no manejo em cativeiro, e a hormônio-terapia com GnRH tem obtido bons resultados. Neste trabalho usamos o *Amazona aestiva*, espécie comum em cativeiro e popular como animal de estimação, para descrever o efeito do uso de buserelina de liberação lenta como estímulo na reprodução em cativeiro. Utilizamos 10 casais adultos da espécie *A. aestiva* mantidos em viveiros suspensos. Foram formados dois grupos de cinco casais cada, sendo um grupo controle e outro grupo tratado com buserelina. Para avaliação do efeito desta aplicação foram acompanhados os índices reprodutivos e perfis hormonais dos dois grupos. As excretas foram coletadas ao menos três vezes por semana entre agosto de 2012 e dezembro de 2012 para monitoramento da atividade gonadal por mensuração de metabólitos de andrógenos nas excretas dos machos e de progestágenos nas excretas de fêmeas. Foram coletadas amostras frescas de excretas, sempre no período entre 14h e 17h, e mantidas congeladas até o processamento. As amostras foram secas em estufa a 57°C, trituradas e os hormônios extraídos utilizando metanol a 80%. A dosagem hormonal foi realizada no Laboratório de Endocrinologia do NUPECCE (Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos) utilizando ensaio imunoenzimático com o anticorpo para andrógenos e progestágenos. Os resultados obtidos foram de atividade reprodutiva de 100% do grupo controle e 60% do grupo tratado, médias de 2,8 ovos no grupo controle e 2,66 ovos no grupo tratado, com índice de fertilidade de 28,6% no grupo controle e 50% no grupo tratado. Os perfis de andrógenos nos machos tratados apresentaram níveis maiores comparados aos controles, enquanto que nas fêmeas não houve efeito nos perfis de progestágenos urofecais. A utilização da buserelina de liberação lenta tem potencial no estímulo da reprodução, principalmente nos machos, e deve ter seu estudo aprimorado para melhor aproveitamento no manejo reprodutivo em cativeiro.

**Palavras-chaves:** buserelina, reprodução, GnRH, psitacídeos

## Introdução

Psitacídeos possuem uma longa história como animais de companhia, porém a criação destes em cativeiro é relativamente recente (STYLES, 2002), principalmente de forma profissional. Atualmente a criação é feita baseada em experiências práticas, com pouco conhecimento técnico e sem a utilização de nenhuma biotécnica reprodutiva. Isso dificulta o entendimento das falhas reprodutivas comumente encontradas, principalmente por não serem encontradas razões para a ocorrência destas (STYLES, 2002).

No Brasil, o papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) é uma das espécies mais comuns como animal de companhia. Ela é uma espécie muito popular por ter grande habilidade de imitação da fala humana e aprendizado de vocabulário além de uma bela plumagem (FORSHAW, 2010; SICK, 1997). É o principal psitacídeo brasileiro criado em cativeiro, mas o abastecimento do comércio ainda é feito principalmente por indivíduos capturados na natureza de forma ilegal. Segundo a IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources), entre 1981 a 2005, foi registrado o comércio de mais de quatrocentos mil indivíduos capturados da natureza (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2012). Por isso, a espécie está incluída no Apêndice II da CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora), mas mesmo assim é classificada pela IUCN com status de conservação “Pouco preocupante” (Least Concern) com a ressalva que a espécie está passando por um decréscimo no número de indivíduos (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2012).

A reprodução de psitacídeos criados legalmente em cativeiro para atender a demanda por animais de estimação é uma alternativa viável na conservação das espécies e deve ser estimulada (FRANCISCO & MOREIRA, 2012). É necessária a utilização de melhores técnicas de manejo e de reprodução em cativeiro para os psitacídeos no intuito de otimizar a disponibilidade dos indivíduos cativos. O *A. aestiva* por sua popularidade e disponibilidade em criadouros é uma espécie com grande potencial para tornar-se modelo biológico para estudos na família e principalmente para psitacídeos sulamericanos de médio e grande porte.

A manipulação hormonal para inibição ou para a estimulação da reprodução tem progredido no uso como uma ferramenta no manejo em cativeiro (ELPHICK et al., 2007) e a hormônio terapia com GnRH tem obtido bons resultados na estimulação (JAWOR et al., 2006; ROBBE et al. 2008; CONSTANTINI et al., 2009; ELNAGAR, 2009).

O GnRH é um hormônio produzido pelo hipotálamo com a função de regular a reprodução nos vertebrados. A estimulação nervosa resulta na ativação do sistema porta-hipotálamo-hipofisário com a liberação de pulsos de GnRH que estimulam a secreção de hormônio folículo-estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) da hipófise anterior (HAFEZ et al., 2004). Nas aves já foram isolados três diferentes isômeros: o chicken GnRH-I (c-GnRH-I), o chicken GnRH-II (c-GnRH-II) e o recém descoberto em pássaros canoros, lamprey GnRH-III (ir-I-GnRH-III) (KING & MILLAR, 1982a, b; MIYAMOTO et al., 1984; KING & MILLAR, 1995; BENTLEY et al., 2003).

Nas aves, o papel do c-GnRH-I está relacionado ao controle do hormônio FSH e LH, porém esta influência sobre o FSH não está totalmente esclarecida (SHARPEN & CICCONE, 2005; RITCHIE & PILNY, 2008). O efeito sobre o LH é estimulatório, uma vez que o aumento dos níveis de c-GnRH-I está ligado à liberação de LH (DUNN & MILLAM, 1998). Já as funções do c-GnRH-III e do ir-I-GnRH-III permanecem como um enigma (BENTLEY et al., 2003).

A administração de GnRH específico de aves, sintético ao específico de mamíferos ou seus análogos estimulou a atividade reprodutiva em diferentes espécies de aves, produzindo aumento de LH plasmático, desenvolvimento gonadal, modificação de comportamentos sexuais e produção de filhotes em estação não-reprodutiva (STERLING & SHARP, 1984; MINOIA et al., 1984; CONSTANTINI et al., 1985; McNAUGHTON et al., 1995; CONSTANTINI et al., 2009).

Os principais fármacos análogos de GnRH a serem utilizados em aves com propósito estimulatório foram *chicken* GnRH-I, lecirelina e busarelina.

O chicken GnRH-I quando utilizado em machos de Juncos (*Junco hyemalis*) promoveu aumentos de curta duração dos níveis de testosterona significativamente quando submetidos à aplicação intramuscular durante o período de reprodução, com

a diminuição crescente da resposta ao fármaco conforme a proximidade da época não-reprodutiva (JAWOR et al., 2006). Já em cardeais (*Cardinalis cardinalis*), ele promoveu o aumento nos níveis de testosterona de machos e fêmeas fora do período reprodutivo, melhorando sua resposta com a proximidade da época reprodutiva (DE VRIES et al., 2011).

O uso de lecorelina subcutânea em canários (*Serinus canaria*) promoveu o início da postura mais cedo e aqueles que foram estimulados com fotoperíodo artificial correspondente ao período reprodutivo realizaram uma segunda postura (ROBBE et al., 2008). Em codornas japonesas (*Coturnix japonica*) ela promoveu aumento no nível plasmático superior ao uso de c-GnRH-I e c-GnRH-II (ZEMAN et al., 1991).

A utilização de busserelina em avestruzes (*Struthio camelus*) promoveu o aumento significativo no número de ovos e filhotes produzidos anualmente (AIUDI et al., 2009). Em galos domésticos Alexandria aumentou os níveis de testosterona circulante, o volume do ejaculado, a concentração e a motilidade espermática destes animais (ELNAGAR, 2009). A busserelina é a única com relatos de utilização em psitacídeos. Em machos de calopsita (*Nymphicus hollandicus*) e cacatua-de-crista-amarela (*Cacatua galerita*) atuou promovendo aumentos nos níveis de testosterona em diferentes estações (LOVAS et al., 2010). Em periquito-australiano (*Melopsittacus undulatus*) o uso de um implante de liberação lenta de busserelina em machos e fêmeas induziu taxas superiores de postura, maior proporção de fertilidade dos ovos e maior concentração dos níveis de esteróides excretados, porém sem modificar os perfis típicos de excreção quando comparados aos outros casais que não receberam o implante (CONSTANTINI et al., 2009).

Sendo assim, nosso trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do uso de um análogo de GnRH, busserelina de liberação lenta, nos índices reprodutivos e perfis endócrinos de Papagaio-verdadeiro (*A. aestiva*).



## **Material e Métodos**

### Aves e Manejo

Este trabalho ocorreu de agosto de 2012 à dezembro de 2012 e utilizou 10 casais e mais quatro machos de *Amazona aestiva* pertencentes ao Criadouro Comercial Brisa, situado em Jaboticabal, São Paulo, Brasil. Eram aves adultas, mantidas em gaiolas suspensas semi-cobertas (1m de largura X 1m de altura X 2m de comprimento) equipadas com ninho externo aos casais, e os outros quatro machos em gaiolas individuais. A alimentação era composta por ração própria e água oferecidos *ad libitum* em recipientes automáticos.

As gaiolas suspensas foram numeradas de 1 a 10 e os papagaios foram identificados da mesma forma em cada gênero.

O manejo reprodutivo foi o de menor interferência possível, com os casais permanecendo juntos durante todo período experimental, sem contato visual entre os casais. Por se tratar de um criadouro comercial, os filhotes nascidos eram retirados com aproximadamente 20 dias após o nascimento.

### Ensaio para determinação da duração de ação do GnRH Depot

O análogo de GnRH que utilizamos foi o Suprefact<sup>®</sup> Depot, cujo princípio ativo é o acetato de busserelina veiculado em nanoesferas de Poli(lactídeo-co-glicolídeo). Este medicamento tem como diferencial ser um implante subcutâneo cuja liberação de princípio ativo ocorre de forma lenta, em humanos durante 2 meses. Porém não há dados relacionados ao tempo de ação em aves, sendo esta informação crucial para determinação do protocolo a ser utilizado em papagaio-verdadeiro para estimulação da atividade reprodutiva.

Para avaliação do tempo de ação do Suprefact<sup>®</sup> Depot em Papagaio-verdadeiro foram utilizados quatro machos que ficaram alojados em gaiolas individuais.

Fora do período reprodutivo (Junho) foi aplicado o Suprefact<sup>®</sup> Depot na dose de 10 µg/kg de peso vivo (CONSTANTINI et al., 2009) em dois machos, sendo os outros dois utilizados como controle. Durante o período de dois meses foram coletadas amostras de excretas dos animais a cada três dias para posterior dosagem hormonal dos níveis de testosterona. As gaiolas foram limpas às 14hrs e

as fezes presentes no fundo da gaiola no início da noite foram integralmente colhidas, estocadas em microtubos e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o seu processamento no laboratório.

Por meio da comparação do perfil hormonal dos dois machos tratados com os dois controles, foi estimado o tempo de ação do Suprefact<sup>®</sup> Depot em Papagaio-Verdadeiro, que foi definida como o período entre o início do aumento dos andrógenos nas excretas até seu retorno aos níveis observados nos animais controle no mesmo momento.

#### Estudo do efeito do implante de GnRH nos casais

Para este estudo foram formados dois grupos, com cinco casais cada. Um deles recebeu o tratamento e o outro foi considerado controle. Para formação dos grupos, foram consideradas as informações existentes para esses animais no ano anterior. Assim, foram ranqueados os casais como reprodutores e não reprodutores. Foram considerados reprodutores aqueles que tiverem pelo menos efetuado postura na estação reprodutiva anterior. Integrantes desses dois status reprodutivos foram distribuídos equitativamente entre os dois grupos experimentais por sorteio. Sendo assim, ficou configurado como grupo tratado os casais 02, 03, 07, 10 e 11.

O protocolo de implante do análogo de GnRH (Suprefact<sup>®</sup> Depot) foi determinado a partir dos resultados obtidos no estudo da duração do fármaco nos machos de papagaio-verdadeiro. Isso porque, esperava-se que houvesse manutenção de altos níveis hormonais por pelo menos dois meses para que houvesse possibilidade de reprodução, tanto de fêmeas quanto de machos. Para tanto, o intervalo entre aplicações do implante foi definido como o tempo entre a aplicação do implante e o início da queda nos níveis hormonais nos machos do estudo de ação do Fármaco. A dose utilizada, tanto para os machos como para as fêmeas, foi de  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  de peso vivo (CONSTANTINI et al., 2009), que foi administrado por via subcutânea após a contenção física dos animais. A aplicação inicial do implante aconteceu no início do período reprodutivo (7 de Agosto 2012) para que a manutenção dos altos níveis hormonais, durante os dois meses, aconteça no momento inicial da reprodução. Os casais que apresentaram postura após a primeira aplicação não receberam outra aplicação para manutenção do

estímulo hormonal, caso contrário, houve a repetição da aplicação no dia 13 de Setembro de 2012.

Os animais do grupo controle, não receberam nenhuma aplicação (nem de solução fisiológica), uma vez que se espera mostrar a diferença entre o método de criação natural, sem interferência, e o método com estímulo externo do análogo de GnRH e com suas contenções sucessivas.

### Dados reprodutivos

A atividade reprodutiva foi acompanhada de todos os casais por observação diária da ocorrência de postura, fertilidade ao décimo dia no exame de ovoscopia e eclosão.

### Colheita das amostras de excretas nos casais

A colheita ocorreu sempre no mesmo horário entre 14h e 17:30h e todas as excretas produzidas neste período foram depositadas em um mesmo recipiente para cada indivíduo, e depois congeladas até o processamento. A individualização da amostra foi possível por meio de uma divisória instalada na gaiola durante a colheita. Devido à característica das excretas da espécie, possuindo fezes e urinas misturadas, optou-se por colher toda a excreta.

A frequência de colheita foi de dois em dois dias, exceto para os casais em atividade reprodutiva como postura, incubação ou criação de filhotes, quando foi realizada colheita diária das excretas.

### Dosagem Hormonal

A atividade gonadal foi monitorada por meio de mensuração dos metabólitos de esteroides sexuais na excretas dos machos (andrógenos) e das fêmeas (progestágenos). Todas as etapas da dosagem hormonal foram realizadas no laboratório de dosagem hormonal do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias câmpus de Jaboticabal (FCAV-UNESP). Os grupos de casais controle e tratamento foram comparados semanalmente desde agosto (31ª semana) até dezembro de 2012 (51ª

semana), sendo as aplicações do implante de GnRH realizadas na 32<sup>a</sup> e 37<sup>a</sup> semanas.

#### Processamento e Extração dos Metabólitos das Excretas

O protocolo de extração dos esteroides das excretas foi baseado na metodologia descrita por Tempel e Gutiérrez (2004). As excretas foram secas em estufa a 57°C por 72 horas e posteriormente trituradas. Para extração utilizou 0,1g de excreta seca em 2mL de metanol a 80%, este conteúdo foi agitado por vortex 30 segundos, agitador horizontal por 12 horas, e novamente por vortex 30 segundos. Após estas etapas, o conteúdo foi centrifugado a 377G por 20 minutos, sendo o sobrenadante transferido para tubos novos e estocados à -20°C. Amostras de excretas secas que não apresentaram a quantidade suficiente para extração conforme o protocolo acima citado foram extraídas respeitando a proporção de metanol 80% ao peso do protocolo.

#### Ensaio Imunoenzimático (EIA)

Os anticorpos utilizados foram o CL425 para progestágenos e o R156/7 para andrógenos, ambos provenientes da California University – DAVIS/CA – USA. A reação cruzada foi descrita por GRAHAM et al. (2001) como: 4-pregnen-3,20-diona (progesterona) 100,0%; 4-pregnen-3a-ol-20-ona 188,0%; 4-pregnen-3b-ol-20-ona 172,0%; 4-pregnen-11a-ol-3,20-diona 147,0%; 5a-pregnan-3b-ol-20-ona 94,0%; 5a-pregnan-3a-ol-20-ona 64,0%; 5a-pregnan-3,20-diona 55,0%; 5b-pregnan-3b-ol-20-ona 12,5%; 5b-pregnan-3,20-diona 8,0%; 4-pregnen-11b-ol-3,20-diona 2,7%; 5b-pregnan-3a-ol-20-ona 2,5%; 5b-pregnan-3a,20a-diol(pregnanediol) <0,1%; outros metabólitos <0,1%. Já a reatividade cruzada do anticorpo R156/7 foi descrita por POLEGATO (2004) como sendo: 100% para testosterona; 57.37% para 5B-dihidrotestosterona; 0.27% para androstenediona; 0.4% para androsterona; e <0,04% para todos os outros metabólitos analisados.

A escolha dos anticorpos ocorreu seguindo o princípio da validação do ensaio (GOYMANN, 2005), e foi realizado no Capítulo 2. Foram utilizados como controle de qualidade interna os coeficientes de variação intra e inter-ensaios baixos (Progestágenos: controle alto 10,9% na ligação e 13,4% na concentração, e

controle baixo 5,9% na ligação e 16,1% na concentração; Andrógenos: controle alto 7,8% na ligação e 13,8% na concentração, e controle baixo 5,2% na ligação e 14,5% na concentração), que asseguram a repetitividade e comparação dos dados obtidos por estes EIAs.

#### Compilação dos resultados e Análise estatística

Os níveis dos esteroides sexuais são apresentados em nanogramas de hormônio por grama de excretas secas (ng/g).

Os dados estão apresentados como médias semanais  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM). Foram comparadas as médias semanais pela análise de variância entre os dois grupos seguido pelo teste  $f$  ( $p < 0,05$ ).

Todas as análises foram feitas com o programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) e os dados sofreram transformação logarítmica.

### **Resultados**

#### Ensaio para determinação da duração de ação do GnRH Depot

Foi possível observar um aumento nos níveis de andrógenos fecais nos machos que receberam o implante comparado aos machos controle (Figura 1). Um dos machos (GnRH1 – Figura 1) que recebeu implante demonstrou um aumento de quase 10 vezes no dia seguinte a aplicação, retornando ao nível inicial após 22 dias e o outro macho (GnRH2 – Figura 1) apresentou um aumento menos expressivo de quase duas vezes no dia seguinte a aplicação, retornando ao nível inicial em 18 dias.

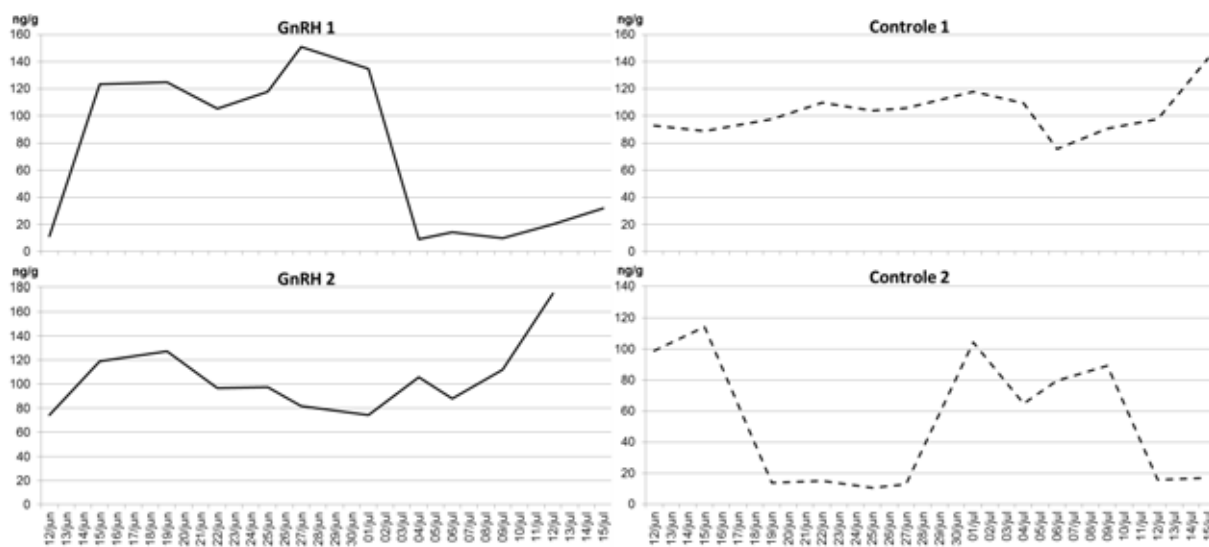


Figura 1 - Valores das concentrações de metabólitos de testosterona em amostras urofecais de Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) após aplicação do agonista de GnRH Depot. O dia 12 de junho indica o momento da aplicação de Suprefact® Depot.

### Dados Reprodutivos

Oito casais apresentaram atividade reprodutiva (cinco do grupo controle e três do grupo tratado), realizando oito ciclos de postura, produzindo um total de 22 ovos (14 pelo grupo controle e 08 pelo grupo tratado) e nascimento de apenas oito filhotes (04 do grupo controle e quatro do grupo tratado). Na tabela 1 é possível visualizar um resumo das atividades reprodutivas ocorridas durante o experimento.

Apesar de não ter eclodido, o segundo ovo do casal 04 apresentou-se fértil na ovoscopia aos 10 dias, sendo a única perda de um ovo fértil, dentre todos botados.

Resumindo, 8 dos 10 casais apresentaram atividade reprodutiva (100% do grupo controle e 60% do grupo tratado). Em média, cada casal botou 2,75 ovos (2,8 ovos grupo controle e 2,66 ovos grupo tratado), com índice de 36,4% de fertilidade (28,6% no grupo controle e 50% no grupo tratado). Analisando somente os casais que produziram filhotes, a fertilidade atingiu 56,2% (55,5% grupo controle e 57,1% grupo tratado). A média de tempo de incubação foi de 28,9 dias e nos casais que apenas botaram ovos inférteis, a média de tempo de abandono do ninho foi 57,2 dias.

Tabela 1 - Atividades reprodutivas ocorridas em 2012 nos grupos controle e tratados com acetato de buserelina de liberação lenta

Casais	Data de Postura*	Data de Eclosão**	Tempo de Incubação**	Abandono do ninho
01 - C	13/08/12	Não houve	---	12/10/12
	17/08/12	Não houve	---	61 dias
	20/08/12	Não houve	---	
03 - T	20/09/12	16/10/12	27 dias	---
	23/09/12	22/10/12	30 dias	---
	26/09/12	24/10/12	29 dias	---
	29/09/12	Não houve	---	---
04 - C	19/09/12	17/10/12	30 dias	---
	22/09/12	Não houve	---	---
	25/09/12***	Não houve	---	---
05 - T	01/11/12	Não houve	---	19/12/12 50 dias
06 - C	05/09/12	02/10/12	28 dias	---
	09/09/12	Não houve	---	---
	12/09/12	Não houve	---	---
07 - T	25/08/12	22/09/12†	29 dias	08/11/12
	29/08/12	Não houve	---	76 dias
	01/09/12	Não houve	---	
08 - C	31/08/12	28/09/12	29 dias	---
	02/09/12	30/09/12	29 dias	---
	07/09/12	Não houve	---	---
09 - C	28/09/12	Não houve	---	08/11/12
	02/10/12	Não houve	---	42dias

C – Grupo controle; T- Grupo Tratado; \*Data provável a partir da primeira visualização do ovo; \*\*Considerando que a ordem de nascimentos dos ovos seja correspondente a mesma ordem da postura; \*\*\* Ovo encontrado no chão do viveiro. Provável postura fora do ninho; † Filhote encontrado morto no dia seguinte ao nascimento. Provável infanticídio pelos pais.

#### Dosagens hormonais

As médias semanais estão na tabela 2 e figuras 2 e 3. Na análise estatística dos níveis dos machos foi possível observar uma diferença significativa entre os grupos nas semanas 35 e 49, nas quais o grupo tratado apresentou um nível maior de andrógenos nas excretas. Já na análise dos níveis das fêmeas houve diferença significativa entre os grupos nas semanas 35, 36, 39 e 44, nas quais o grupo controle apresentou um nível maior de progestágenos nas excretas.

Tabela 2 – Médias semanais de esteróides sexuais em , sob efeito de implante de análogo GnRH de liberação lenta.

Semana	Média de Andrógenos (ng/g)		Média de progestágenos (ng/g)	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
31	71,6	79,3	20,9	12,3
→ 32	102,2	152,8	48,3	21,0
33	112,5	131,3	22,1	14,9
34	100,2	146,1	19,7	49,9
35	94,9	199,7*	78,6*	36,1
36	91,1	149,6	74,2*	23,6
→ 37	101,7	144,2	33,3	39,1
38	87,5	155,8	43,9	32,2
39	84,3	93,2	96,4*	35,0
40	72,8	113,1	16,5	17,4
41	45,7	68,8	7,8	8,8
42	67,1	92,2	19,4	21,2
43	90,4	94,1	31,6	26,3
44	105,8	78,2	30,4	66,5*
45	115,2	78,5	35,7	31,1
46	106,6	106,6	35,6	52,6
47	94,4	73,0	31,9	22,9
48	98,4	75,3	26,1	23,6
49	82,5	162,7*	10,4	10,6
50	122,4	99,2	33,7	46,1
51	99,4	76,5	42,8	33,3

→ Semana que ocorreu a aplicação do implante de buserelina; \* Médias significativamente maiores.



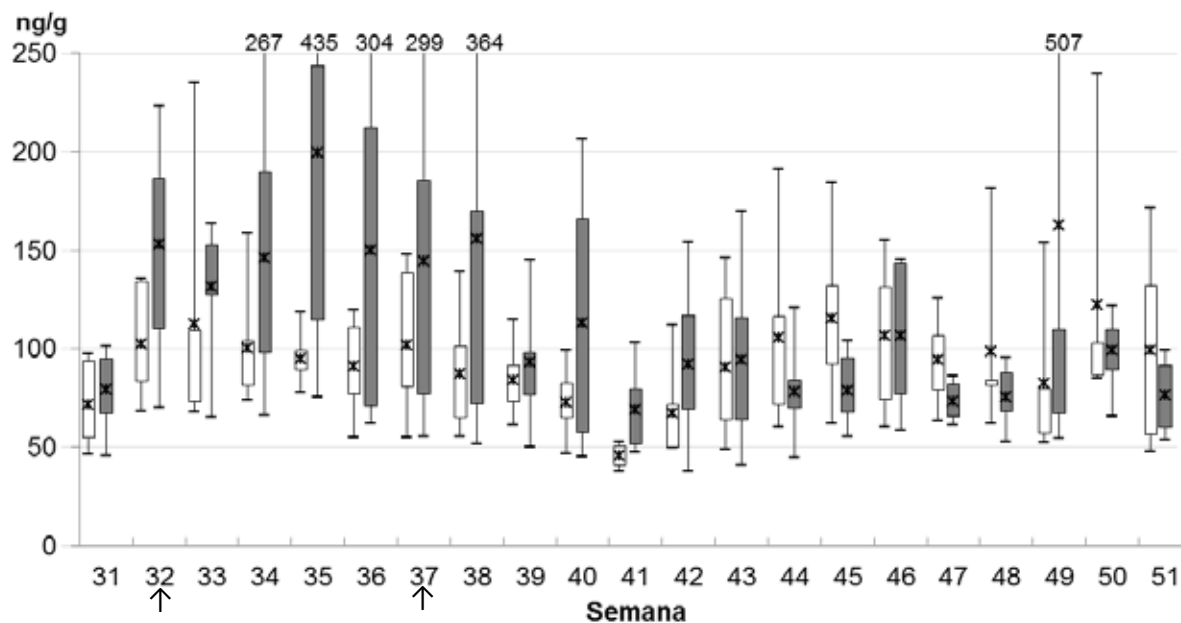


Figura 2- Box-plot dos níveis semanais de andrógenos urofecais de machos de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) no período entre a 31ª semana (agosto) e 51ª semana (dezembro) de 2012. Caixas Vazias: Grupo Controle; Caixas Preenchidas: Grupo Tratado. (x) Médias; ↑ Semana que ocorreu a aplicação do implante de buserelina.

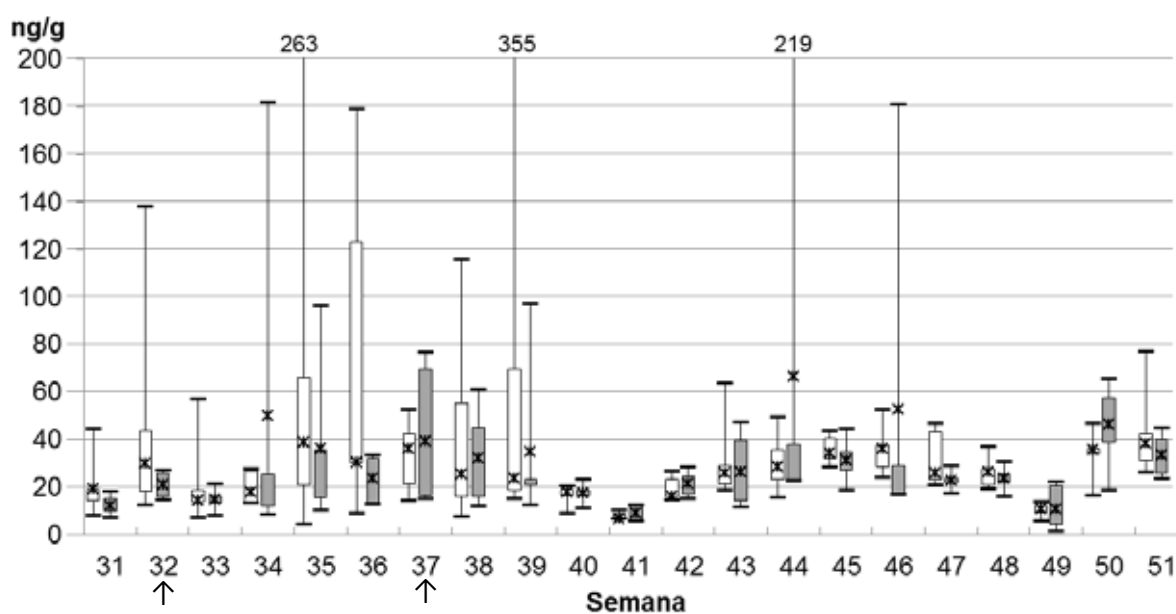


Figura 3 - Box-plot dos níveis semanais de progestágenos urofecais de fêmeas de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) no período entre a 31ª semana (agosto) e 51ª semana (dezembro) de 2012. Caixas Vazias: Grupo Controle; Caixas Preenchidas: Grupo Tratado. (x) Médias; ↑ Semana que ocorreu a aplicação do implante de buserelina.

## Discussão

O desafio com GnRH é usado nas aves para acessar as condições reprodutivas dos indivíduos e pesquisadores tem usado sua resposta para comparar diferentes classes, populações e relacionar a atividades, idade e status social (JAWOR et al., 2006). Há também relatos com sucesso do uso de seus agonistas de GnRH no tratamento de desordens reprodutivas (MANS & PILNY, 2014). Isto pode ser observado no ensaio para determinação do tempo de ação do busarelina de liberação lenta, no qual houve diferença na resposta ao implante entre os dois machos, sendo que em um deles a resposta foi muito mais acentuada. Podemos relacionar esta diferença com o potencial para reprodução de cada um dos machos e sua disponibilidade de receptores para o LH produzido pelo análogo de GnRH utilizado, conseqüentemente produzindo uma quantidade diferente de andrógenos. Com este resultado, podemos considerar a utilização da busarelina em machos de *Amazona aestiva* como uma ferramenta na identificação de machos aptos a produção de testosterona gonadal, como já constatado em outras espécies de aves, inclusive psitacídeos (ELNAGAR, 2009; LOVAS et al., 2010).

Os dados reprodutivos do grupo controle e do grupo tratado apresentaram índices muito semelhantes, exceto pelo fato de todos os cinco casais do grupo controle terem realizado postura e no tratado somente três. Podemos destacar que o grupo tratado apresentou um maior índice de fertilidade, indicando uma melhor capacidade dos machos que receberam o implante em produzir ovos férteis, sugerindo ser este tratamento uma alternativa nos casos de infertilidade na reprodução de *A. aestiva* em cativeiro. O uso do mesmo implante de análogo de GnRH de liberação lenta em avestruz (*Struthio camelus*) e periquito-australiano (*Melopsittacus undulatus*) elevou o número de postura, ovos e filhotes (AIUDI et al., 2009; COSTANTINI et al., 2009), resultado não alcançado em nosso trabalho, o que demonstra a necessidade de maiores estudos deste tratamento estimulatório em *A.aestiva*.

Os níveis de andrógenos comparados entre os grupos tiveram diferença significativa em duas semanas após a aplicação do implante de busarelina, com níveis maiores de testosterona no grupo tratado durante quase todo tempo experimental. Isso corrobora com outros trabalhos realizados com aves silvestres,

que também tiveram a secreção de testosterona estimulada pela aplicação de um análogo de GnRH (JAWOR et al., 2006; AIUDI et al., 2009; CONSTANTINI et al., 2009; LOVAS et al., 2010; DE VRIES et al., 2011). A aplicação de buserelina em galos em doses crescentes obteve níveis de testosterona também crescentes, porém na avaliação espermática houve um decréscimo no volume, concentração e motilidade (ELNAGAR, 2009), o que demonstra que altos níveis de testosterona podem ser deletérios à qualidade do sêmen, implicando a necessidade de avaliações mais completas no uso de buserelina no estímulo a atividade reprodutiva em machos de *A. aestiva*.

O ensaio de estímulo com análogo de GnRH utilizado neste trabalho pode ser usado na identificação de machos com gônadas ativas, uma vez que a secreção de andrógenos em resposta a aplicação de GnRH só tem origem gonadal (DE VRIES et al., 2011).

Nas fêmeas de *A. aestiva* o implante de buserelina de liberação lenta não demonstrou estimular atividade gonadal secretora de progestágenos. Isto porque os perfis do grupo controle e grupo tratado não demonstraram diferenças, exceto por algumas semanas significativamente maiores por parte do grupo controle, impulsionadas provavelmente pelo pico de progestágenos durante a realização de posturas. Nossos resultados não eliminam a possibilidade do implante de buserelina ter um efeito estimulatório em fêmeas de *A. aestiva*, pois a liberação de LH, resultado de nosso estímulo, atuará sobre as células da granulosa dos folículos ovarianos para a produção de progesterona e, se estes não estiverem ativos, esta produção pode ser prejudicada. Podemos então considerar que no momento da aplicação do implante de buserelina, as fêmeas não estavam em atividade gonadal plena, o que pode ter prejudicado o estímulo reprodutivo do análogo de GnRH.

Até o momento da redação deste trabalho, não foram encontrados relatos da dosagem de progestágenos em fêmeas de aves após a estimulação por buserelina ou outro análogo de GnRH.

A utilização do análogo de GnRH também poderia ter um efeito negativo sobre a reprodução de *A. aestiva*, como já relatado para diversas outras espécies de

aves, sendo inclusive utilizado para tratamento de desordens reprodutivas de posturas indesejadas (MANS & PILNY, 2014). Avaliando os índices reprodutivos e os perfis hormonais, não encontramos indícios de qualquer efeito negativo.

Concluimos então que a utilização de busserelina de liberação lenta no intuito de estimular a reprodução de *A. aestiva*, e de outros psitacídeos, tem um potencial positivo e devem ser realizados estudos mais profundos e com outros parâmetros além da dosagem hormonal para evitar a influência de outras desordens reprodutivas como problemas comportamentais e incompatibilidade no pareamento de casais.

### **Referências Bibliográficas**

AIUDI, G.; NICASSIO, M.; PAGANA, G.; SILVESTRE, F.; LACALANDRA, G. M. Induction of sexual activity in male and female farmed ostriches (*Struthio camelus*) with GnRH implant. **Italian Journal of Animal Science**, v. 8, n. 4, p. 789-792, 2009.

BENTLEY, G. E.; MOORE, I. T.; SOWER, S. A.; WINGFIELD, J. C. Evidence for a novel gonadotropin-releasing hormone in hypothalamic and forebrain areas in songbirds. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 63, n. 1, p. 34-46, 2003.

BIRDLIFE INTERNATIONAL 2012. *Amazona aestiva*. In: IUCN 2013. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2013.1. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 11 September 2013

COSTANTINI, V.; CINONE, F.; LACALANDRA, G. Early oviposition in *Serinus canaria* after endonasal administration of Gn-RH.(Preliminary research)]. **Bollettino della Società italiana di biologia sperimentale**, v. 61, n. 4, p. 633, 1985.

COSTANTINI, V.; CARRARO, C.; BUCCI, F.; SIMONTACCHI, C.; LACALANDRA, G.; MINOIA, P. Influence of a new slow-release GnRH analogue implant on reproduction in the Budgerigar (*Melopsittacus undulatus*, Shaw 1805). **Animal reproduction science**, v. 111, n. 2, p. 289-301, 2009.

DEVRIES, S. M.; HOLBROOK, A. L.; WINTERS, C. P.; JAWOR, J. M. Non-breeding gonadal testosterone production of male and female Northern Cardinals (*Cardinalis cardinalis*) following GnRH challenge. **General and comparative endocrinology**, v. 174, n. 3, p. 370-378, 2011.

DUNN, I. C.; MILLAM, J. R. Gonadotropin releasing hormone: forms and functions in birds. **Poultry and avian biology reviews**, v. 9, n., p., 1998.

ELNAGAR, S. A. Response of Alexandria cockerels reproductive status to GnRH (Receptal) injection. **International Journal of Poultry Science**, v. 8, n. 3, p. 242-246, 2009.

ELPHICK, C. S.; REED, J. M.; DELEHANTY, D. J. Applications of reproductive biology to bird conservation and population management. In: (Ed.). **Reproductive biology and phylogeny of aves (birds)**. Enfield (NH): Science Publishers. p, 2007, p.367-399.

FORSHAW, J. M. **Parrots of the World**: Princeton University Press, 2010

FRANCISCO, L.; MOREIRA, N. Manejo, reprodução e conservação de psitacídeos brasileiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 4, p. 215-219, 2012.

GOYMANN, W. Noninvasive monitoring of hormones in bird droppings: physiological validation, sampling, extraction, sex differences, and the influence of diet on hormone metabolite levels. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 1, p. 35-53, 2005.

GRAHAM, L.; SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; GALAMA, W.; SAVAGE, A. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum. **Zoo Biology**, v. 20, n. 3, p. 227-236, 2001.

HAFEZ, E.; JAINUDEEN, M.; ROSNINA, Y. Hormônios, fatores de crescimento e reprodução. In: Hafez, E. e Hafez, B. (Ed.). **Reprodução animal**, 2004. v.7, p.33-54.

JAWOR, J. M.; MCGLOTHLIN, J. W.; CASTO, J. M.; GREIVES, T. J.; SNAJDR, E. A.; BENTLEY, G. E.; KETTERSON, E. D. Seasonal and individual variation in response to GnRH challenge in male dark-eyed juncos (*Junco hyemalis*). **General and comparative endocrinology**, v. 149, n. 2, p. 182-189, 2006.

KING, J. A.; MILLAR, R. P. Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. I. Structural determination on partially purified material. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 18, p. 10722-10728, 1982.

KING, J. A.; MILLAR, R. P. Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. II. Isolation and characterization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 18, p. 10729-10732, 1982.

KING, J. A.; MILLAR, R. P. Evolutionary aspects of gonadotropin-releasing hormone and its receptor. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 15, n. 1, p. 5-23, 1995.

LOVAS, E.; JOHNSTON, S.; FILIPPICH, L. Using a GnRH agonist to obtain an index of testosterone secretory capacity in the cockatiel (*Nymphicus hollandicus*) and sulphur-crested cockatoo (*Cacatua galerita*). **Australian veterinary journal**, v. 88, n. 1-2, p. 52-56, 2010.

MANS, C.; PILNY, A. Use of GnRH-agonists for Medical Management of Reproductive Disorders in Birds. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 17, n. 1, p. 23-33, 2014.

MCNAUGHTON, F.; DAWSON, A.; GOLDSMITH, A. A comparison of the responses to gonadotrophin-releasing hormone of adult and juvenile, and photosensitive and photorefractory European starlings, *Sturnus vulgaris*. **General and comparative endocrinology**, v. 97, n. 1, p. 135-144, 1995.

MINOIA, P.; DE BENEDICTIS, G.; LACALANDRA, G.; LATERZA, V.; BUFO, P. Reproductive conditioning of the partridge (*Perdix perdix*) with GnRH and an increase in the photoperiod]. **Bollettino della Società italiana di biologia sperimentale**, v. 60, n. 6, p. 1153, 1984.

MIYAMOTO, K.; HASEGAWA, Y.; NOMURA, M.; IGARASHI, M.; KANGAWA, K.; MATSUO, H. Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 12, p. 3874-3878, 1984.

POLEGATO, B. F. Validação de método endócrino não-invasivo para monitoramento de fisiologia reprodutiva e de atividade dos glicocorticóides em cervídeos neotropicais. 2004. 43 f. **Monografia** (Trabalho de graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

RITCHIE, M.; PILNY, A. A. The Anatomy and Physiology of the Avian Endocrine System. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2008.

ROBBE, D.; TODISCO, G.; GIAMMARINO, A.; PENNELLI, M.; MANERA, M. Use of a synthetic GnRH analog to induce reproductive activity in canaries (*Serinus canaria*). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 22, n. 2, p. 123-126, 2008.

SHARP, P.; CICCONE, N. The gonadotrophin releasing hormone neurone: key to avian reproductive function. In: (Ed.). **Functional Avian Endocrinology**, 2005, p.59-72.

SICK, H. **Ornitologia brasileira Ornitologia brasileira Ornitologia brasileira**, 1997 (Rio de Janeiro: Nova Fronteira)

STERLING, R.; SHARP, P. A comparison of the luteinizing hormone-releasing activities of synthetic chicken luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH), synthetic porcine LH-RH, and Buserelin, and LH-RH analogue, in the domestic fowl. **General and comparative endocrinology**, v. 55, n. 3, p. 463-471, 1984.

STYLES, D. K. Reproductive management of captive psittacine collections. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 5, n. 3, p. 475-487, 2002.

TEMPEL, D. J.; GUTIÉRREZ, R. Factors related to fecal corticosterone levels in California spotted owls: implications for assessing chronic stress. **Conservation Biology**, v. 18, n. 2, p. 538-547, 2004.

ZEMAN, M.; JURANI, M.; VYBOH, P.; BARTH, T. Effects of chicken GnRH-I, GnRH-II and their analogues on plasma testosterone and reproduction in Japanese quail. **Biopharm**, v. 1, n., p., 1991.